



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104271166 B

(45)授权公告日 2016.12.07

(21)申请号 201380010634.9

(22)申请日 2013.02.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104271166 A

(43)申请公布日 2015.01.07

(30)优先权数据
61/601653 2012.02.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.08.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/027230 2013.02.22

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/126635 EN 2013.08.29

(73)专利权人 新特斯有限责任公司
地址 瑞士奥伯多夫

(72)发明人 W.兹扎贾 D.D.克赖里奥克

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 初明明 彭昶

(51)Int.Cl.
A61L 27/20(2006.01)
A61L 31/04(2006.01)
A61L 27/58(2006.01)
A61L 31/14(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010052585 A2,2010.05.14,
CN 101522228 A,2009.09.02,
CN 102352051 A,2012.02.15,
US 2007213522 A1,2007.09.13,
WO 2010052583 A2,2010.05.14,
EP 2198895 A2,2010.06.23,
WO 2005018492 A2,2005.03.03,
审查员 杨金辉

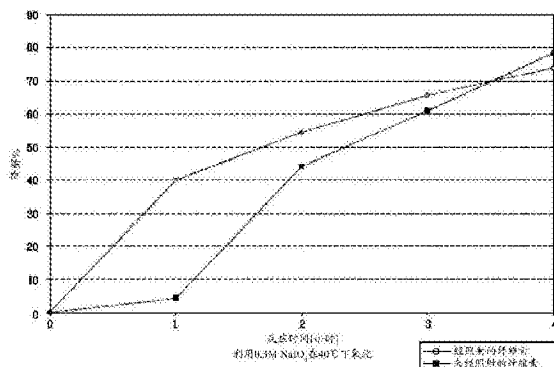
权利要求书3页 说明书22页 附图17页

(54)发明名称

基于吸收性纤维素的生物材料和植入物

(57)摘要

本公开描述了一种用于组织替代或扩充的植入物,所述植入物包括由经照射纤维素和氧化剂的前体反应性混合物形成的经照射的氧化纤维素的吸收性无热原多孔主体,其中所述主体形成不均匀的三维纤维状网络。还公开了一种用于制备氧化的纤维素主体的方法,所述方法包括照射纤维素的主体以形成经照射的纤维素主体,以及使所述经照射的纤维素主体与氧化剂反应以形成无热原多孔的和吸收性的氧化的纤维素主体。



1. 一种生物材料前体反应性混合物,包括:
以下的反应性混合物:
 - (a) 经照射的纤维素;和
 - (b) 氧化剂,其中所述氧化剂选自偏高碘酸盐、次氯酸盐、重铬酸盐、过氧化物、高锰酸盐和二氧化氮;
其中经照射的纤维素已经用电离辐射照射,并且
其中所述生物材料前体反应性混合物的反应产物为无热原吸收性生物材料。
2. 根据权利要求1所述的反应性混合物,其中所述经照射的纤维素为微生物来源的纤维素。
3. 根据权利要求2所述的反应性混合物,其中所述微生物来源的纤维素来源于木葡糖醋杆菌。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的反应性混合物,其中所述反应产物具有20%至70%范围内的氧化度。
5. 一种用于组织替代或扩充的植入物,包括:
经照射的氧化纤维素的多孔主体,其通过使经照射的纤维素与氧化剂反应来形成,其中所述氧化剂选自偏高碘酸盐、次氯酸盐、重铬酸盐、过氧化物、高锰酸盐和二氧化氮;
其中经照射的纤维素已经用电离辐射照射,并且
其中所述主体形成不均匀的三维纤丝状网络。
6. 根据权利要求5所述的植入物,其中所述植入物具有第一刚性状态。
7. 根据权利要求6所述的植入物,其中所述植入物具有第二水合状态,并且其中所述植入物在通过生物相容性流体水合时从所述第一刚性状态转变成所述第二水合状态。
8. 根据权利要求7所述的植入物,其中处于所述水合状态的所述植入物的表面与解剖表面相适应。
9. 根据权利要求8所述的植入物,其中所述解剖表面为软组织的表面。
10. 根据权利要求9所述的植入物,其中所述软组织为硬脑膜组织。
11. 根据权利要求7所述的植入物,其中处于所述水合状态的所述植入物的表面与第二医疗装置的表面相适应。
12. 根据权利要求5-11中任一项所述的植入物,其中所述多孔主体在SBF条件下在一周之后具有0%至90%范围内的体外降解特征。
13. 根据权利要求5-11中任一项所述的植入物,其中所述多孔主体在SBF条件下在四周之后具有20%至80%范围内的体外降解特征。
14. 根据权利要求5-11中任一项所述的植入物,其中所述植入物具有至少7.0的持水量(WHC),并且其中所述氧化剂具有至少0.3M的浓度。
15. 根据权利要求5-11中任一项所述的植入物,其中所述植入物具有表面积和持水量(WHC),并且其中所述WHC与表面积比率为至少2.7:1。
16. 根据权利要求5-11中任一项所述的植入物,其中所述植入物为用于活性剂的支架或载体。
17. 根据权利要求16所述的植入物,其中所述活性剂浸渍在所述多孔主体内。
18. 根据权利要求16所述的植入物,其中所述活性剂被涂布到所述植入物的表面上。

19. 根据权利要求16所述的植入物,其中所述活性剂选自骨髓、自体移植物、骨诱导性小分子、成骨材料、干细胞、骨形态发生蛋白、抗菌剂、磷酸钙陶瓷、以及它们的混合物和共混物。

20. 根据权利要求7-11中任一项所述的植入物,其中所述植入物在水合状态下为半透明的。

21. 一种制备氧化的纤维素主体的方法,包括以下步骤:

(a) 用电离辐射来照射纤维素的主体以便形成经照射的纤维素主体,以及

(b) 使所述经照射的纤维素主体与氧化剂反应以便形成氧化的纤维素主体,其中所述氧化剂选自偏高碘酸盐、次氯酸盐、重铬酸盐、过氧化物、高锰酸盐和二氧化氮;

其中所述氧化的纤维素主体为无热原的、多孔的和吸收性的。

22. 根据权利要求21所述的方法,还包括使所述经照射的纤维素主体至少部分地脱水的步骤。

23. 根据权利要求21所述的方法,还包括使所述氧化的纤维素主体至少部分地脱水的步骤。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述使所述经照射的纤维素主体脱水的步骤通过机械地挤压所述纤维素主体来进行。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中所述使所述氧化的纤维素主体脱水的步骤通过使用超临界二氧化碳的临界点干燥来进行。

26. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述氧化剂为偏高碘酸钠。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述纤维素和偏高碘酸盐以纤维素比偏高碘酸盐为1:1至1:160的摩尔比范围反应。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述纤维素和偏高碘酸盐以纤维素比偏高碘酸盐为1:1至1:120的摩尔比范围反应。

29. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述氧化剂在所述反应中具有0.05M至0.5M的浓度范围。

30. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述氧化剂在所述反应中具有0.2M至0.4M的浓度范围。

31. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述氧化剂和所述纤维素反应0.1小时至24小时。

32. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述氧化剂和所述纤维素反应0.1小时至6小时。

33. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中在所述氧化剂与所述经照射的纤维素之间反应一个小时之后,所述氧化的纤维素主体具有至少25%的氧化度。

34. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中在所述氧化剂与所述经照射的纤维素之间反应两个小时之后,所述氧化的纤维素主体具有至少40%的氧化度。

35. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中在所述氧化剂与所述经照射的纤维素之间反应之后,所述氧化的纤维素主体具有20%至70%的氧化度。

36. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述照射步骤包括用10kGy至100kGy的范围内的电离辐射照射。

37. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述照射步骤包括用20kGy至40kGy的范围内的电离辐射照射。

38. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述照射步骤包括穿透 γ 辐射。

39. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,还包括使所述纤维素的主体、所述经照射的纤维素主体、或所述氧化的纤维素主体中的任一者与一种或多种活性剂接触的步骤。

40. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述照射的步骤包括仅单次剂量的辐射。

41. 根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述照射的步骤包括至多五次剂量的辐射。

基于吸收性纤维素的生物材料和植入物

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2012年2月22日提交的美国临时专利申请序列号61/601,653的优先权,其公开内容据此以引用方式并入,如同全文示出于本文中一样。

技术领域

[0003] 本公开涉及可用作医疗植入物的吸收性的、多孔的和适应的生物材料,并且涉及经 γ 照射的纤维素的受控氧化方法以提供所述生物材料。植入物可形成为片材或补片,以用于组织替代或扩充、尤其用于软组织指征、并且更尤其与硬脑膜一起使用。

背景技术

[0004] 在创伤性、赘生性、炎性损害,外科切除,或者先天性缺失之后指示需要硬脑膜修复(硬脑膜成形术)。硬脑膜替代用于其中自然脑膜的原发性闭合不可能实现的颅外科手术中。在历史上,已使用过多种材料,包括金属箔、人体组织、动物组织(猪真皮、牛骨胶原和心包膜)和聚合物(PTFE、丙交酯双聚合物、甲基丙烯酸羟乙酯)。动物组织一直是当前可用的最好材料,其中猪真皮和牛骨胶原为市场引领流(如, Duragen[®]、Duraform[®])。然而,动物材料因可导致疯牛病的朊病毒而带有感染的可能性。另外,牛骨胶原常常在两周内、硬脑膜完全愈合之前被吸收。另外,牛心包膜有时与具有天然生物毒性的戊二醛发生交联。合成材料具有操作缺陷并且如果未适当地缝合固定则可导致脑脊液(CSF)渗漏。

[0005] 各种源的纤维素已被证明为通用的生物材料。通过仅将约每种类型的植物和选定数量的细菌进行合成,就可获得用于多种应用中的天然的、可再生的、生物相容性的、和生物降解性的聚合物。

[0006] 然而,天然纤维素因缺少能够分解其高度结晶结构的酶机制而不能被人体吸收,所述高度结晶结构通过中间和内部的氢键而为稳定的。然而可通过利用各种化学物质的氧化来实现纤维素的吸收性,所述化学物质包括偏高碘酸盐、次氯酸盐、重铬酸盐、或二氧化氮(参见Stilwell等人,Oxidized cellulose: Chemistry, Processing and Medical Applications, Handbook of Biodegradable Polymers:1997, 291-306)。氧化的植物纤维素已被成功地用作吸收性止血剂(1949以来的强生的Surgicel[®]和更近期的2006年以来的捷力特医疗公司(Gelita Medical)的 Gelitacel[®])。由基于植物的氧化纤维素构成的产品常常被用作止血剂、伤口敷料和抗粘连阻隔剂(参见美国专利6,800,753;Stilwell等人,1997)。

[0007] 通过二氧化氮蒸气的使用能最有效地氧化植物纤维素。然而,存在被视为源自二氧化氮气体的使用的毒性效应;然而偏高碘酸钠已证明为在氧化高度结晶纤维素时的较好选择且具有极少的副反应(参见Nevell T.,Oxidation, Methods in Carbohydrate Chemistry, New York:Academic Press1963;3:164-185)。其氧化效果和使用方法已针对植物纤维素进行了广泛研究(参见Stilwell等人,1997;Kim等人,Periodate oxidation of

crystalline cellulose, Biomacromolecules2000;1:488-492);Calvini等人,FTIR and WAXS analysis of periodate oxycellulose:Evidence for a cluster mechanism of oxidation, Vibrational Spectroscopy2006;40:177-183);Singh等人,Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose, Biomaterials1982;16-20);Devi等人,Biosoluble surgical material from 2,3-dialdehyde cellulose, Biomaterials1986;7:193-196);Laurence等人,Development of resorbable macroporous cellulosic material used as hemostatic in an osseous environment, J Biomed Mater Res2005;73A:422-429);Roychowdhury和Kumar,Fabrication and evaluation of porous 2,3-dialdehyde cellulose membrane as a potential biodegradable tissue-engineering scaffold, J Biomed Mater Res2006;76A:300-309)。使用高碘酸盐的氧化机制依赖于吡喃葡萄糖环中的C2-C3键的裂解和二醛基团的形成。据信,此类二醛纤维素通过身体中的生理条件下的水解而降解成2,4-二羟基丁酸和乙醇酸(参见Singh等人,1982)。这些降解产物中的两者已知为生物相容性和生物降解性的,并且可被身体代谢(参见Devi等人,1986;Singh等人,1982)。一旦引发降解过程,其就沿着构成纤维素网络的葡聚糖链继续进行(参见Stilwell等人,1997)。

[0008] 用于细菌来源的纤维素的氧化的方法也已在美国专利7,709,631中有所描述。细菌来源的纤维素具有源自其三维结构的独特的物理特性和机械特性。由于其处理特性、生物相容性和安全性,其已用于若干医疗装置中,例如如美国专利7,374,775和7,510,725中所述。由醋杆菌(被重新分类为木葡糖醋杆菌)合成的一种类型的微生物纤维素的特征在于由纯纤维素纳米纤维组成的高度结晶的三维网络。微生物纤维素长期以来已被视为下述生物材料,所述生物材料可应用于临时性伤口覆盖、慢性伤口和烧伤治疗,用作组织生长、人造血管的支架,以及用于多种其他生物医学应用(Fontana等人,Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute, Appl Biochem Biotechnol1990;24/25:253-264);Alvarez等人,Effectiveness of a Biocellulose Wound Dressing for the Treatment of Chronic Venous Leg Ulcers:Results of a Single Center Random, Wounds2004;16:224-233);Czaja等人,The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, Biomacromolecules2007;8(1):1-12);Klemm等人,Cellulose:Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, Angew Chem, Int Ed2005;44:3358-3393);Bodin等人,Bacterial cellulose as a potential meniscus implant, J Tissue Eng and Regen Med2007;1(5):406-408);Svensson等人,Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, Biomaterials2005;26(4):419-431)。

[0009] 尽管用于氧化纤维素的方法广泛地描述于文献中,但它们通常不能产生具有用于医疗医用的最可取特性的均一氧化材料。对于软组织应用(例如硬脑膜修复应用)而言尤其如此,其中材料需要能够再水合、易于与身体的各种轮廓相适应、具有足够的强度以允许容易的操作,但在与特定解剖部位的愈合一致的时间范围上应为可吸收的。因此,需要氧化纤维素生物材料以及用于制备可实现这些可取特性的所述氧化纤维素生物材料的方法。

[0010] 理想的材料应能够防止CSF渗漏、具有良好的生物相容性、不存在可能的感染风险、具有良好的术中操作性、具有类似于硬脑膜的机械特性、具有有益于组织再生长的吸收

特征、并且易于获得和储存。

发明内容

[0011] 本公开描述了一种可用作吸收性生物材料的经照射的氧化纤维素,所述吸收性生物材料由经照射的纤维素和氧化剂的前体反应性混合物形成。所述经照射的氧化纤维素的反应产物是无热原的并且可为多孔的吸收性生物材料。根据一个实施例,经照射的纤维素为微生物来源的纤维素,并且在优选的实施例中来源于木葡糖醋杆菌。所描述的吸收性生物材料可具有可变的氧化度范围,所述氧化度根据一个实施例可在约0%至约99%氧化的范围内,例如,在约20%至约70%的范围内。

[0012] 本公开另外描述了一种可用于组织修复、替代、或扩充的医疗植入物,所述医疗植入物由经照射的氧化纤维素的多孔主体形成,所述经照射的氧化纤维素根据一个实施例可通过使经照射的纤维素与氧化剂反应来形成。形成植入物的氧化纤维素主体具有无序的、不均匀的三维纤维状网络,从而可允许植入物在接触生物相容性流体(如,水、盐水、血液、脑脊液等)时从第一刚性(脱水)状态迅速地转变成第二水合状态。水合状态下的植入物可根据一个实施例具有与解剖表面相适应,优选地与软组织表面相适应,并且更优选地与硬脑膜组织表面相适应的表面。根据另一个实施例,植入物的表面与第二医疗装置相适应。根据另一个实施例,植入物可为用于活性剂的支架或载体。例如,活性剂可浸渍在植入物的多孔主体内,或者可涂布到植入物的表面上,或者这两者。根据一个实施例,可基本上在植入时或即将植入时(即,外科手术进行时)来将活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上。在可供选择的实施例中,可在植入时间之前(即,外科手术之前)来将活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上。在某些实施例中,可将多于一种的活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上,并且此外可在不同的时间段来将多于一种的活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上。例如,一些活性剂可在外科手术之前与植入物进行混合,而其他活性剂可在外科手术进行时混合。

[0013] 本公开还描述了一种制备多孔的并且吸收性的氧化的纤维素主体的方法,所述方法包括:

[0014] (a)照射纤维素的主体以便形成经照射的纤维素主体,以及

[0015] (b)使经照射的纤维素主体与氧化剂反应以便形成氧化的纤维素主体。

[0016] 所形成的氧化的纤维素主体可根据一个实施例为多孔的、无热原的和吸收性的。

[0017] 根据一个实施例,所述方法还可包括优选地通过机械地挤压纤维素主体来使经照射的纤维素主体部分地脱水的步骤。根据另一个实施例,所述方法还可包括优选地通过使用超临界二氧化碳的临界点干燥来使氧化的纤维素主体至少部分地脱水的步骤。根据另一个实施例,照射无热原主体的步骤可包括一次或者作为另外一种选择多于一次的照射剂量或照射曝光。

附图说明

[0018] 附图大体以举例的方式而非以限制性的方式示出本文档论述的各种实施例。在结合附图阅读上述发明内容以及以下对本申请优选实施例的详细说明时能够更好地进行理解。

- [0019] 图1为氧化纤维素的所提议的体内降解的图示；
- [0020] 图2为根据本公开的处于水合状态的经照射的氧化纤维素植入物和也处于水合状态的未经照射的氧化纤维素植入物的顶视图、并排相片；
- [0021] 图3为根据本公开的经照射的氧化纤维素的氧化度以及未经照射的氧化纤维素的氧化度的图形表示；
- [0022] 图4为根据本公开的经照射的氧化纤维素的破裂强度、纤维素含量和表面积的图形表示；
- [0023] 图5为未经照射的氧化纤维素样品的破裂强度、纤维素含量和表面积的图形表示；
- [0024] 图6A-6C分别为天然纤维素、未经照射的氧化纤维素和根据本公开的经照射的氧化纤维素的样品的SEM图像；
- [0025] 图7A-7C分别为天然纤维素、未经照射的氧化纤维素和根据本公开的经照射的氧化纤维素的样品的XRD图像；
- [0026] 图8为根据本公开的经照射的氧化纤维素的一系列体外降解特征的图形表示；
- [0027] 图9为根据本公开的未经照射的氧化纤维素和根据本公开的经照射的氧化纤维素的体外降解特征的图形比较；
- [0028] 图10为天然纤维素样品、根据本公开的经照射的氧化纤维素样品和根据本公开的在体外降解测试之后的经照射的氧化纤维素样品的分子量分布的图形表示；
- [0029] 图11为经受不同辐射水平的四个氧化纤维素样品的顶视图相片；
- [0030] 图12A-F为在体内动物研究期间的各个时间段处拍摄的本发明的经照射的氧化纤维素样品的相片；
- [0031] 图13为用于体内研究中的测得的根据本公开的经照射的氧化纤维素样品的体外降解特征相比于现有技术的商业氧化纤维素样品的体外降解特征的图形表示。

具体实施方式

[0032] 在此文档中，术语“一种”或“一个”用于包括一个或多个，并且术语“或者”用于指非排它性“或者”，除非另外指明。另外，应当理解，本文使用的并且未以其它方式限定的措辞或术语仅用于描述的目的，而非进行限制。此外，此文档中提及的所有出版物、专利、和专利文献均全文以引用方式并入本文，如同单独以引用方式并入一样。如果此文档与以引用方式并入的那些文献之间存在不一致的用法，则并入的参考文献中的用法应视为此文档的补充形式；对于不可协调的不一致性，此文档中的用法起作用。在表达值的范围时，另一实施例包括从所述一个特定值和/或到另一特定值。相似地，当前面用“约”将数值表示为近似值时，应当理解，该具体值构成了另一个实施例。所有范围均可被包括并进行组合。此外，在提到以范围形式表述的值时，包括该范围内的每一值。还应当理解，为清晰起见在本文各独立实施例的上下文中描述的本发明的某些特征，也可以组合形式提供在单个实施例中。相反地，本发明的各种特征为简明起见可在单个实施例的上下文中进行阐述，也可分开地或以任何子组合形式被提供。

[0033] 如本文所用，“纤维素的主体”及其衍生形式和变型形式，例如，“纤维素主体”、“经照射的纤维素主体”、“氧化的纤维素主体”、“微生物纤维素的主体”等等旨在描述呈任何类型的形状或空间构造的纤维素集合，并非意图限制将纤维素集合限定为任何特定的取向或

构型,除非本文另外明确指明。根据本公开的纤维素主体的非限制例子可包括纤维素片材、纤维素隔膜、纤维素薄膜、纤维素膜、纤维素补片、和/或纤维素样品。

[0034] 如本文所用,“天然纤维素”及其衍生形式和变型形式旨在描述处于纯化状态的植物源和微生物源形式的纤维素。例如,在本文所述的某些实施例中,“天然纤维素”是指未经受任何形式的氧化或照射的任何源的纤维素。

[0035] 根据本公开,描述了一种经照射的氧化纤维素的吸收性生物材料,所述吸收性生物材料由经照射的纤维素和氧化剂的前体混合物形成。所述经照射的氧化纤维素的吸收性生物材料的反应产物是无热原的并且可为多孔的吸收性生物材料。纤维素可来源于植物源或微生物源。根据一个实施例,经照射的纤维素为微生物来源的纤维素,并且优选地来源于木葡糖醋杆菌。

[0036] 任何合适的氧化剂可用于反应性混合物中以与根据本公开的经照射的纤维素反应。合适的氧化剂的一些例子可包括偏高碘酸盐、次氯酸盐、重铬酸盐、过氧化物、高锰酸盐或二氧化氮。优选的氧化剂为偏高碘酸钠。根据一个实施例,氧化剂可具有约0.01M至约10.0M,优选地约0.05M至约1.0M,并且更优选地约0.1M至约0.5M的浓度范围。

[0037] 纤维素主体的照射可通过提供纤维素主体的纤维网络内的化学、结构和形态学变化来导致后续氧化反应中的变化。例如,辐射处理可(除了别的以外)提高阳离子选择通透性、隔膜传导性,并且可导致氢键变化。辐射纤维素的吡喃葡萄糖链化学结构可降低纤维素结晶度和平均分子量,并且增加可用的表面积。尽管不受任何具体理论的约束,但据信,可源自照射处理的纤维素的化学和物理变化使得纤维素更适于化学处理;即,氧化。此外还据信,在氧化之前照射纤维素隔膜导致产生具有较短的并且能更有效氧化的吡喃葡萄糖链的多孔生物材料,这种吡喃葡萄糖链较易于被生物相容性流体触及。相比之下,应当预期到,未经照射的氧化纤维素平均具有较长的吡喃葡萄糖链,这种吡喃葡萄糖链包含较无规分散的二醛基团并且还继续保持相对高的结晶结构。由照射形成的较短葡萄糖链因此可导致以下纤维素主体,所述纤维素主体在氧化过程中可达到比相应的未经照射的纤维素主体更高的总氧化纤维素量。较高百分比的氧化葡萄糖链可导致经照射的氧化纤维素主体的较快速和较均一降解。如此前所述并且如图1所示,假定氧化纤维素的体内降解主要通过水解成2,4-二羟基丁酸和乙醇酸而发生。纤维素主体的降解中的至多90%可以此方式发生。一旦降解过程被引发,其就沿着构成纤维素主体的葡萄糖链继续进行。还可发生另外的降解,这种降解可占纤维素主体的剩余10%,其中二醛基团的水解已使得大葡萄糖链断裂成较小的多糖或寡糖,这些较小的多糖或寡糖进一步地通过吞噬作用而从主体清除掉。

[0038] 所描述的无热原吸收性生物材料可具有可变的氧化度范围,所述氧化度根据一个实施例可在约0%至约99%氧化的范围内,例如,在约20%至约70%的范围内。经照射的氧化纤维素的氧化度可取决于所选择的氧化剂、氧化剂的浓度范围、反应雾度、以及经照射的纤维素与氧化剂之间的反应时间段。根据一个实施例,氧化度在约15%至约80%的范围内,并且在另一个实施例中,在约20%至约70%的范围内。

[0039] 根据本公开,描述了一种植入物,所述植入物具有足够的机械强度、对解剖表面的适应能力和吸收特征,从而可用于组织修复、替代、和/或扩充,尤其可用于软组织应用,并且更尤其可用作硬脑膜替代补片。植入物包括通过使经照射的纤维素与氧化剂反应形成的经照射的氧化纤维素的多孔主体。纤维素的多孔主体为无热原的并且具有纤维素的不均匀

三维纤丝状网络,所述不均匀三维纤丝状网络可在接触生物相容性流体(如,水、盐水、血液、CSF等)时从第一刚性(脱水)状态转变成第二水合状态。图2为根据本公开的一个实施例的处于水合状态的植入物10以及处于水合状态的未经照射的氧化纤维素植入物20的顶视图。处于第二水合状态的植入物10可根据一个实施例为半透明的(如图2所示),并且可呈纤维素补片的形式。如本文所用,“半透明的”是指处于水合状态的植入物的下述能力,即,允许光以扩散方式穿过以使得视野被照亮但不可避免地不能透过植入物清晰地观察到物体。

[0040] 植入物的多孔特性允许流体的快速吸收(水合)以及允许植入时组织向内生长。根据一个实施例,处于水合状态的植入物具有足够的耐久性和破裂强度(在下文中进行更详细地解释)以便被操纵和植入到所需的解剖位置,并且对于规则和不规则轮廓的解剖表面均显示出所需的附着性和粘附性。根据一个实施例,处于水合状态的植入物的表面与(在下文中进行更详细地解释)解剖表面相适应,优选地与软组织的表面相适应,并且更优选地与硬脑膜组织表面相适应。在另一个实施例中,植入物可附着到解剖表面且无需缝合或固定装置的辅助;即,植入物为自附着的/自固定的。然而,应当理解,如果需要,可在缝合或固定装置的辅助下来将植入物固定到解剖表面。

[0041] 在某些医疗手术中,希望在解剖位置处提供有附加的医疗装置以便在修复位点处提供附加的支承、固定、和/或稳定。在需要此类第二医疗装置的情况下,处于水合状态的植入物表面与解剖表面、第二医疗装置表面、和/或者这两个表面相适应。合适的第二医疗装置的例子可包括但不限于骨螺钉、骨板、金属和聚合物网片、以及金属和聚合物板和帽盖(例如,用于颅外科手术中的那些)。

[0042] 根据一个实施例,形成植入物的经照射的氧化纤维素的多孔主体具有在接触生物相容性流体时从第一刚性(脱水)状态转变成第二水合状态的能力。处于第二水合状态的植入物具有针对解剖表面的适应能力,如下文更详细所述。在某些实施例中,转变可发生在短的时间段内。例如,根据一个实施例,植入物可在约短于10分钟内从第一刚性状态转变成第二水合状态。根据其他实施例,植入物可在约短于五分钟内、约短于30秒内、约短于10秒内、约短于5秒内、或约短于2秒内从第一刚性状态转变成第二水合状态(例如,完全水合)。

[0043] 根据一些实施例,形成植入物的经照射的氧化纤维素的多孔主体还可将处于第二水合状态的生物相容性流体的量(以质量或体积测得)固定和保持为大于处于第一刚性状态的植入物的干燥质量。植入物可在从第一刚性状态转变成第二水合状态期间实现的水含量可通过其持水量(WHC)值来测量。WHC值将在下文中进行更详细地解释,但通常为处于第二水合状态的植入物中的生物相容性流体的质量相对于处于第一刚性状态的植入物的干燥质量的量度。WHC值越大,则植入物吸收生物相容性流体的能力就越高。尽管不受任何具体理论的约束,但据信,植入物的相对其干重吸收足够大量的流体的能力可与植入物表面与规则和不规则解剖表面以及第二医疗装置表面相适应的能力具有直接相关性。根据一个实施例,植入物具有至少约7.0的WHC,其中氧化剂具有0.3M或更高的浓度。根据另一个实施例,植入物的WHC值相对其表面积(以平方厘米测量)的比率为至少约2.7:1。

[0044] 植入物具有可变的降解特征范围,所述降解特征可被操纵以与旨在植入所述植入物的临床指征一致。例如,当植入物被选择为用作硬脑膜替代补片时,形成植入物的多孔主体可具有基本上匹配自然硬脑膜的自然组织替代速率的降解特征。在仿真体内环境的条件下进行的体外降解测试可被执行以评估植入物相对于所需临床指征(例如,作为硬脑膜替

代物或止血剂)的降解特征。体外测试可根据需要来执行任意时间长度,例如,一天、一周、四周、两个月、六个月、一年、或多年。根据一个实施例,多孔主体在仿真体液(SBF)下具有约0%至约90%范围内的一周体外降解特征(如在下文中进行更详细地解释)。根据另一个实施例,当氧化剂具有大约0.1M的浓度时,多孔主体具有约0%至40%范围内的一周体外降解特征。根据另一个实施例,当氧化剂具有大约0.3M的浓度时,多孔主体具有约20%至90%范围内的一周体外降解特征。根据另一个实施例,当多孔主体已被氧化至少一个小时时,多孔主体具有约0%至60%范围内的一周体外降解特征。根据另一个实施例,当多孔主体已被氧化至少三个小时时,多孔主体具有约15%至80%范围内的一周体外降解特征。在某些优选的实施例中,多孔主体在四周之后测得具有约80%至约100%的体外降解速率。

[0045] 根据本公开的另一个实施例,植入物可为用于一种或多种活性剂的支架或载体。可将活性剂浸渍到形成植入物的纤维素的多孔主体内、涂布到植入物的表面上、和/或这两者。根据一个实施例,可基本上在植入时或即将植入时(即,术中)来将活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上。在可供选择的实施例中,可在植入时间之前(即,外科手术之前)来将活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上。在某些实施例中,可将不止一种活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上,并且此外可在不同的时间段来将不止一种活性剂浸渍到植入物内和/或涂布到植入物上。例如,一些活性剂可在外科手术之前与植入物进行混合,而其他活性剂可在手术进行时混合。可与植入物一起使用的活性剂包括适用于在解剖位置处进行治疗的任何组合物,例如,骨髓、自体移植物、骨诱导性小分子、成骨材料、干细胞、骨形态发生蛋白、抗菌剂、磷酸钙陶瓷、以及它们的混合物和共混物。

[0046] 本公开还描述了一种制备多孔的并且吸收性的氧化的纤维素主体的方法,所述方法包括:

[0047] (a)照射纤维素的主体以便形成经照射的纤维素主体,以及

[0048] (b)使经照射的纤维素主体与氧化剂反应以便形成氧化的纤维素主体。

[0049] 所形成的氧化的纤维素主体可根据一个实施例为多孔的、无热原的、和吸收性的。

[0050] 根据一个实施例,所述方法还可包括优选地通过机械地挤压纤维素主体来使经照射纤维素的主体部分地脱水的步骤。根据另一个实施例,所述方法还可包括优选地通过使用超临界二氧化碳的临界点干燥来使氧化的纤维素主体至少部分地脱水的步骤。根据另一个实施例,所述方法可包括使纤维素的无热原主体、经照射的纤维素主体、和/或氧化的纤维素主体与一种或多种活性剂接触。

[0051] 根据本发明的方法,任何合适的氧化剂均可用于与经照射的纤维素主体进行反应。合适的氧化剂的一些例子可包括偏高碘酸盐、次氯酸盐、重铬酸盐、过氧化物、高锰酸盐或二氧化氮。优选的氧化剂为偏高碘酸钠。根据所述方法的一个实施例,纤维素和偏高碘酸盐以纤维素比偏高碘酸盐为1:1至约1:160的摩尔比范围反应,并且在另一个实施例中,纤维素和偏高碘酸盐以纤维素比偏高碘酸盐为1:1至约1:120的摩尔比范围反应。在优选的实施例中,纤维素和偏高碘酸盐以纤维素比偏高碘酸盐为约1:120的摩尔比反应。氧化剂的摩尔浓度范围可根据需要而有所变化。根据所述方法的一个实施例,氧化剂在反应中具有约0.05M至约1.0M的浓度范围,并且在另一个实施例中,氧化剂在反应中具有约0.1M至约0.4M的浓度范围。同样,经照射的纤维素主体与氧化剂之间的反应时间可根据需要而有所变化。根据所述方法的一个实施例,氧化剂和纤维素反应约0.1小时至约72小时,并且在另一个实

施例中,氧化剂和纤维素反应约3小时至约12小时。例如,在处于或接近40℃的反应温度下,氧化剂可在约0.1M/约5小时至约0.5M/约12小时的浓度/时间范围下与纤维素进行反应。优选地,氧化剂可在约0.2M至约0.4M的浓度范围下存在约5小时。

[0052] 根据本公开的方法的使经照射的纤维素主体与氧化剂反应以形成氧化的纤维素主体的过程可产生可变的氧化度。根据所述方法的一个实施例,在氧化剂与纤维素之间反应一小时之后,氧化的纤维素主体具有至少约25%的氧化度。根据另一个实施例,在氧化剂与纤维素之间反应两小时之后,氧化的纤维素主体具有至少约40%的氧化度。并且在另一个实施例中,在氧化剂与纤维素之间反应两小时之后,氧化的纤维素主体具有至少约45%的氧化度。在某些实施例中,根据本文所述的方法的实施例形成的氧化的纤维素主体具有约20%至约70%范围内的氧化度。

[0053] 根据本公开的一个实施例,可按照下述方式来使用制备方法。

[0054] 纤维素主体的制备

[0055] 在制备本公开的吸收性生物材料期间,在包含约30℃的并且初始pH为约4.1-4.5的液体培养基的生物反应器中培养(温育)木葡糖醋杆菌(醋杆菌)细胞。可利用例如蔗糖作为碳源、铵盐作为氮源、并且玉米浆作为营养源来实现纤维素制备。通过在具有减少蒸发的封盖的浅生物反应器中进行发酵过程。此类系统能够提供有助于确保形成均一纤维素薄膜的限氧条件。生物反应器的尺寸可根据所合成的纤维素的所需形状、尺寸、厚度和收率而有所变化。

[0056] 温育步骤之后的主发酵过程通常在静态条件下进行约8-120小时、优选地约24-72小时的持续时间,在此期间,培养基中的细菌合成并且沉积成包含微生物的纤维素片材薄层,由此形成纤维素隔膜。根据所需厚度和/或纤维素收率,可停止发酵,此时可从生物反应器中获取隔膜。根据一个实施例,在相对较短的持续时间之后停止主发酵以产生均一的、低纤维素含量的隔膜(薄膜)。然后通过标准分离技术(例如,压缩或离心)来移除包含在薄膜中的多余培养基,这可导致部分脱水的薄膜。

[0057] 纤维素主体纯化

[0058] 部分脱水的纤维素薄膜随后可经受纯化处理,所述纯化处理导致纤维素成为无热原的。根据一个实施例,纯化方法为纤维素隔膜的化学纯化。使纤维素经受一系列苛性(例如,浓缩的氢氧化钠)化学洗涤步骤以将纤维素隔膜转换成无热原材料,然后利用过滤水进行浸泡和/或冲洗,直至达到中性pH。作为另外一种选择,或者结合这些步骤,还可进行稀醋酸中的短时间浸泡以确保中和剩余的氢氧化钠。使用多种暴露时间、浓度和温度的纯化工工艺,以及包括挤压的机械技术可用于未纯化的纤维素隔膜。已结合约30℃至约100℃的温度变化研究了氢氧化钠中的约1至约12小时的处理时间,以优化该工艺。优选的或推荐的处理温度出现在70℃下或该温度附近。

[0059] 可通过鲎变形细胞溶解物试验(LAL)来测量处理之后留在纤维素主体中的内毒素的量。本文所述的清洁过程能够提供无热原的纤维素隔膜(<0.06EU/ml),其满足硬脑膜替代材料的FDA要求。根据一个实施例,在纤维素隔膜的纯化之后,可将薄膜机械地压缩到所需的重量和厚度。

[0060] 纤维素主体的照射

[0061] 根据本公开,利用电离辐射来照射无热原的纤维素隔膜。根据一个实施例,辐射为

γ 辐射。纤维素隔膜可吸收约10kGy至约100kGy范围内并且更优选地约20kGy至约40kGy范围内的穿透辐射。在具体实施例中,纤维素隔膜可吸收约20kGy至约26.5kGy范围内的穿透型 γ 辐射。在本公开的一个实施例中,以单次曝光或剂量形式来提供辐射。在可供选择的实施例中,可通过多于一次的曝光来提供辐射。例如,根据本公开的纤维素主体可根据本公开而被照射一次、两次、或三次。此外,在对纤维素主体施用多于一次的剂量或曝光的情况下,多次剂量中的每一次穿透纤维素主体并且被纤维素主体吸收的辐射可具有变化的范围。本领域技术人员应当理解,曝光次数和辐射强度可根据需要而有所变化。

[0062] 除了照射之外,可将纤维素隔膜预浸泡在电解质溶液中,以便促进更均一的氧化并且增加氧化速率。电解质可得自硫酸盐或氯化物系列,优选NaCl。电解质浓度可在约0.001M至约1.0M、优选地约0.05M至约0.1M、并且更优选地约0.2M至约0.4M的范围内。预浸泡可持续30分钟至1个月、优选地10小时至24小时的范围。

[0063] 经照射的纤维素主体的氧化

[0064] 在照射和任选的预浸泡步骤之后,接下来使纤维素隔膜与合适的氧化剂反应,所述氧化剂可包括例如铬酸、次氯酸盐、重铬酸盐、二氧化氮、四氧化二氮、或偏高碘酸盐。根据一个实施例,氧化剂为偏高碘酸盐。应该指出的是,当选择偏高碘酸盐时,反应优选地在黑暗环境中进行。根据一个实施例,与氧化剂的氧化反应持续约30分钟至72小时范围内、优选地约2-16小时范围内、并且更优选地约2-6小时范围内的时间段。氧化反应通常可在18°C至60°C、优选地30°C至50°C的温度范围下、并且更优选地在约40°C下进行。根据另一个实施例,与氧化剂的氧化反应持续至少约一个小时的时间段,并且在另一个实施例中持续至少约3个小时。容器设置在摇动器上并且在20-500rpm、优选地350-450rpm下进行摇动。纤维素和偏高碘酸盐之间的摩尔比可保持在1:1-1:160的范围下、优选地1:1-1:120的范围下、并且更优选地为约1:120。在氧化反应完成时,可将氧化纤维素隔膜在冰浴上的过滤水中洗涤多次以移除过量的偏高碘酸盐。作为另外一种选择,可将氧化纤维素隔膜在乙二醇中进行洗涤以中和偏高碘酸盐,随后在DI水中进行多次漂洗。

[0065] 除了上述氧化过程之外或者作为上述氧化过程的另外一种选择,在氧化之前,可将纤维素隔膜研碎以形成浆料并且随后均匀加工成纤维素纤维的细小悬浮液。然后利用偏高碘酸钠来氧化均匀加工的悬浮液,如此前所述。然后回收并且洗涤氧化纤维素悬浮液以移除过量的偏高碘酸盐。然后将悬浮液设置在模具中并且进行交联以再次形成稳定的氧化纤维素隔膜。

[0066] 在另一个可供选择的实施例中,纤维素隔膜可在氧化之前进行临界点干燥。临界点干燥为分步过程,其中利用与水共溶的非水溶剂(例如,乙醇)来置换纤维素隔膜中的水。然后利用液态二氧化碳来置换乙醇。此干燥过程可增强氧化剂渗透到纤维素隔膜内。使干燥的隔膜与氧化剂反应(如上所述),并且按照上文所述的方式进行回收和洗涤。

[0067] 使用超临界二氧化碳的纤维素主体的干燥

[0068] 在上文所述的氧化工艺中的任何一个之后,可通过使用超临界二氧化碳的临界点干燥来进一步地干燥纤维素隔膜。如此前在上文所解释的,利用非水溶剂(如,乙醇)来置换纤维素隔膜中的水。然后通过称为临界点干燥的工艺利用液态二氧化碳来置换溶剂。在临界点干燥期间,将纤维素隔膜加载到夹持器上、夹在不锈钢网板之间、并且随后浸入包含超临界二氧化碳的处于压力下的腔室中。夹持器被设计成允许CO₂循环穿过纤维素隔膜,同时

网板固定隔膜以防止隔膜在干燥过程中波动起伏。一旦所有的有机溶剂均已被移除(在最典型的情况下,在约1-6小时的范围内),就将液态CO₂温度增加到二氧化碳的临界温度之上,使得CO₂形成超临界流体/气体。由于此转换期间不存在表面张力的事实,所得的产品为保持形状、厚度、和三维结构的干燥隔膜。将干燥的产品进行切割、包装和消毒。

[0069] 实例

[0070] 除非本文另外指明,用于以下实例中的经照射的纤维素在约20-26.5kGy的范围内进行照射。

[0071] 除非本文另外指明,用于实例中的天然纤维素在其进行照射和/或氧化之前与氧化纤维素(经照射的以及未经照射的)具有类似的纤维素含量(以g/cm²测量)。

[0072] 样品的氧化百分比

[0073] 通过测量存在的醛含量来确定纤维素隔膜中的氧化纤维素的百分比。例如,使氧化样品在搅拌的烧杯中与70°C的10m10.05M NaOH反应15-25分钟。然后将悬浮液冷却至室温并且添加10ml的0.05M HCl以中和NaOH。利用酚酞作为指示剂通过0.01M NaOH来滴定过量的酸。利用下述公式来计算纤维素样品的氧化百分比:

$$[0074] \quad \text{氧化}\% = [(M_{\text{NaOH Tit}} * V_{\text{NaOH Tit}}) * (MW_{\text{氧化纤维素}} / M_{\text{纤维素}}) * 100] / 2$$

[0075] 表1

[0076]

M _{NaOH Tit}	滴定w所用的NaOH/酚酞指示剂的摩尔浓度
V _{NaOH Tit}	滴定步骤中所用的NaOH的体积
MW _{氧化纤维素}	氧化纤维素的分子量(162g/mol)
M _{氧化纤维素}	氧化纤维素样品的质量(克)
100	用于转换成百分比
2	说明氧化纤维素的二醛性质

[0077] 图3为显示出根据上文所述的方法针对根据本公开的经照射的氧化纤维素以及未经照射的氧化纤维素计算的氧化度的图形表示。将0.3M恒定浓度和40°C恒定温度的高碘酸钠用作氧化剂。在0-4小时的时间段内测量样品中的氧化百分比。

[0078] 适应能力测试

[0079] 通过如下方式来测试适应能力:在SBF溶液(pH=7.4)中再水合脱水的纤维素样品并且测试其与颅脉动模型(Synthes, Inc.)的解剖学正确表面上的不规则部分相适应的能力。将在0.3M高碘酸盐、40°C、3小时条件下氧化的干燥氧化植入物样品(经照射的和未经照射的)设置在颅脉动模型的湿润表面上并且利用SBF进行冲洗。适应样品如下定义:1)显示出快速的再水合(从第一刚性状态转变成第二水合状态),例如,在30秒内、在20秒内、在10秒内、并且优选地在5秒内;2)完全附接到模型的表面;并且3)在至多1分钟的仿真脉动期间附着到表面。

[0080] 颅脉动模型示于并且描述于WD Losquadro等人的“Poly lactide-co-glycolide Fiber-Reinforced Calcium Phosphate Bone Cement,”Arch Facial Plast Surg,11(2), 2009年3月/4月,第105-106页中。此脉动模型由Synthes公司设计和制造。此模型由6个解剖学正确的成人颅骨构成,这些成人颅骨具有仿真颅骨缺损的各种直径的开口。颅骨由固体泡沫聚氨酯制成并且硬脑膜由硅树脂制成。每个颅骨附接到单独的水泵,所述水泵具有与

外部环境密封的水并且来自所述泵的水能够被推压到仿真硬脑膜材料的内部以模拟硬脑膜脉动。

[0081] 为了仿真外科伤口环境,将颅骨模型放置在封闭的水浴中,所述水浴利用循环水加热器保持在恒定的37℃和95%–100%的相对湿度下。水浴内的水到达颅骨模型的基部但未冲洗缺损区域。程控封闭的水泵以仿真约1.7mm至2.0mm的硬脑膜脉动位移的术中观察值。

[0082] 破裂强度测试

[0083] 利用由Synthes,USA制备并且校准在11.4kg(25磅)下的手动耐破度测试仪来测试各种尺寸的氧化纤维素样品的球破裂强度。用于测量破裂强度的测试方法是基于ASTM D2207-00(重新核准版2010)中描述的工序“Standard Test Method for Bursting Strength of Leather by the Ball Method”的。将干燥样品在SBF中再水合5分钟并且随后夹在含有1英寸直径的中心开口的不锈钢夹持器之间。测试方法被设计成通过测量促使具有球形末端的柱塞穿过氧化纤维素隔膜所需的力来测量样品的破裂强度;即,使用柱塞来穿透样品直至失效,此时以数字化方式测量力。

[0084] 纤维素含量测量

[0085] 使具有已知表面积样品在55℃的烘箱风干过夜。通过将干燥样品的重量除以其表面积并且以g/cm²表示来测量纤维素含量。

[0086] 经照射的氧化纤维素样品和未经照射的氧化纤维素样品的与包括纤维素含量、表面积、破裂强度、和适应能力的上述实验相关的数据分别以图形方式示于图4和图5中。将样品在40℃下利用0.3M恒定浓度的高碘酸钠氧化约0–5小时的时间范围。如根据此前针对适应能力所述的标准进行测量,所测试的并且示于图4中的经照射的氧化样品当在全部值下进行再水合时均为相适应的。相比之下,所测试的并且示于图5中的未经照射的氧化样品当仅在竖直虚线左侧(即,在小于2小时的氧化时间下)的值内进行再水合时为相适应的。

[0087] SEM观察结果

[0088] 将包括天然纤维素、未经照射的氧化纤维素和经照射的氧化纤维素的纤维素隔膜样品利用超临界CO₂进行干燥并且利用金进行涂布。在0.3M高碘酸盐、40℃、3小时的条件下进行氧化。使用工作在20kV下的日立场发射扫描电子显微镜来检查样品。图6A–6C分别为天然纤维素、未经照射的氧化纤维素和经照射的氧化纤维素样品的SEM图像。SEM图像显示,如图6A所示的天然纤维素具有纤维素链的纤丝状的、三维取向的和有序的结构。如图6B所示的未经照射的氧化纤维素具有比天然纤维素更紧凑的结构并且具有堆叠在一起的较大原纤维区域。如图6C所示的经照射的氧化样品通常不如上述纤维素样品有序、具有较混乱的结构,这种结构与其他纤维素样品相比具有通常更小的原纤维和通常较高的不均质区域出现率。

[0089] X射线衍射(XRD)测试

[0090] 将包括天然样品、未经照射的氧化样品、和经照射的氧化样品的干燥的纤维素隔膜样品设置在XRD样品杯架中、放置在XRD盒内、并且放后设置到用于测量的装置内。在0.3M高碘酸盐、40℃、3小时的条件下进行氧化。利用由PANalytical XRD系统产生的Ni过滤的Cu-K α 辐射来记录X射线衍射光谱。扫描在4–90° 2 θ 范围内来执行,但从4–40° 2 θ 范围进行分析。利用HighScore Plus XRD来分析数据。图7A–7C分别为天然样品、未经照射的氧化样品、

和经照射的氧化样品的XRD光谱。如在XRD显示图中所见,天然样品(图7A)具有高度有序的结晶结构,之后是未经照射的纤维素样品(图7B),且经照射的样品(图7C)显示最无序的结晶结构。

[0091] 利用下述公式来计算结晶度百分比:

[0092] $CrI = 100 \times [(I_{002} - I_{Amorph}) / I_{002}]$,

[0093] 其中CrI为结晶度, I_{002} 为(002)晶格衍射($22^\circ 2\theta$)的最大强度,并且 I_{Amorph} 为 $18^\circ 2\theta$ 下的衍射强度。以下的表2示出了用于所测量纤维素样品的测量的结晶度指数。

[0094] 表2

[0095]

纤维素样品	CrI[%]
天然样品	81.9
未经照射的氧化样品	36.3
经照射的氧化样品	35.3

[0096] 再水合/持水量测量

[0097] 对于此实验,将经照射的和未经照射的纤维素主体切割成 $4\text{cm} \times 5\text{cm}$ 样品。使这些样品在 40°C 以及下述条件下经受高碘酸盐溶液以进行氧化:

[0098]

高碘酸盐摩尔浓度(M)	时间(小时)
0.1	3
0.1	5
0.2	4
0.3	3
0.3	4
0.3	5
0.4	3
0.4	4
0.4	5
0.4	6

[0099] 经照射的和未经照射的纤维素样品的反应均进行两次。在每次反应完成之后,通过根据此前在本文所公开的方法进行洗涤和 CO_2 干燥来制备用于测试的样品。

[0100] 接下来,通过测量未经照射的样品及其经照射的对应样品来获得所有样品的初始重量和表面积尺寸。利用准备有20ml SBF的培养皿,将纤维素的未经照射的样品在此流体放置30秒并且随后进行称重。然后针对经照射的样品重复此水合步骤。针对制备的所有样品重复水合30秒并且随后称出润湿质量的过程。利用以下公式来计算每种条件下的持水量(WHC):

$$\text{润湿质量(g)} = \text{WHC}$$

[0101]

$$\text{干燥质量(g)}$$

[0102] 取WHC的平均值以测量未经照射的纤维素和经照射的纤维素在水合能力方面的差

异。另外测量每个样品的WHC和表面积(SA)之间的关系。下表3示出了经照射的氧化纤维素和未经照射的氧化纤维素的每个样品在给定氧化参数下的各个样品结果。下表4提供了经照射的氧化样品和未经照射的氧化样品中的每一个在给定氧化参数下的平均WHC和WHC/SA值的汇总。

[0103] 表3

[0104]

样品	条件	干燥质量(g)	表面积(cm ²)	润湿质量(g)	WHC	平均WHC	WHD/表面积(SA)	平均(WHC / SA)
0.1M / 3 小时	经照射的	0.0357	13.02	1.0740	30.08	30.08	2.311	2.311
0.1M / 3 小时	未经照射的	0.0639	18.62	0.9750	15.26	15.26	0.819	0.819
0.1M / 5 小时	经照射的	0.0323	12.3	0.6970	21.58	21.58	1.745	1.745
0.1M / 5 小时	未经照射的	0.0643	13.26	0.9690	15.07	15.07	1.136	1.136
0.2M / 4 小时	经照射的	0.0281	6.16	0.4240	15.09	15.09	2.450	2.450
0.2M / 4 小时	未经照射的	0.0429	6.16	0.4580	10.68	10.68	1.733	1.733
0.3M / 3 小时	经照射的	0.0248	4.56	0.4040	16.29	14.12	3.572	3.085
0.3M / 3 小时	经照射的	0.0251	4.6	0.3000	11.95		2.598	
0.3M / 3 小时	未经照射的	0.0507	3.57	0.3470	6.84	7.02	1.917	1.965
0.3M / 3 小时	未经照射的	0.0423	3.57	0.3040	7.19		2.013	
0.3M / 4 小时	经照射的	0.0240	2.55	0.2350	9.79	9.06	3.840	3.382
0.3M / 4 小时	经照射的	0.0270	2.85	0.2250	8.33		2.924	
0.3M / 4 小时	未经照射的	0.0604	2.52	0.2690	4.45	4.91	1.767	1.826
0.3M / 4 小时	未经照射的	0.0590	2.85	0.3170	5.37		1.885	
0.3M / 5 小时	经照射的	0.0197	2.21	0.1660	8.43	8.69	3.813	4.058
0.3M / 5 小时	经照射的	0.0225	2.08	0.2014	8.95		4.303	
0.3M / 5 小时	未经照射的	0.0560	2.08	0.1990	3.55	3.49	1.708	1.732
0.3M / 5 小时	未经照射的	0.0555	1.95	0.1990	3.42		1.756	
0.4M / 3 小时	经照射的	0.0196	3	0.1830	9.34	9.62	3.112	3.207
0.4M / 3 小时	经照射的	0.0212	3	0.2100	9.91		3.302	
0.4M / 3 小时	未经照射的	0.0577	2.38	0.2510	4.35	4.16	1.828	1.888
0.4M / 3 小时	未经照射的	0.0511	2.04	0.2030	3.97		1.947	
0.4M / 4 小时	经照射的	0.015	1.8	0.1000	6.67	8.74	3.704	5.366
0.4M / 4 小时	经照射的	0.0175	1.54	0.1894	10.82		7.028	
0.4M / 4 小时	未经照射的	0.0453	1.95	0.1940	4.28	3.94	2.196	2.189
0.4M / 4 小时	未经照射的	0.0425	1.65	0.1530	3.60		2.182	

[0105]

0.4M / 5 小时	经照射的	0.0170	4.3	0.1230	7.24	7.69	5.566	5.497
0.4M / 5 小时	经照射的	0.0140	1.5	0.1140	8.14		5.429	
0.4M / 5 小时	未经照射的	0.0326	1.3	0.1100	3.37	3.24	2.596	2.476
0.4M / 5 小时	未经照射的	0.0360	1.32	0.1120	3.11		2.357	
0.4M / 6 小时	经照射的	0.0112	1.2	0.1160	10.36	9.49	8.631	7.904
0.4M / 6 小时	经照射的	0.0137	1.2	0.1180	8.61		7.178	
0.4M / 6 小时	未经照射的	0.0418	0.9	0.1170	2.80	2.52	3.110	2.577
0.4M / 6 小时	未经照射的	0.0307	1.1	0.0690	2.25		2.043	

[0106] 表4

[0107]

氧化值	平均WHC		平均(WHC/SA)	
	经照射的	未经照射的	经照射的	未经照射的
0.1M/3小时	30.08	15.26	2.3106	0.8195
0.1M/5小时	21.58	15.07	1.7544	1.1365
0.2M/4小时	15.09	10.68	2.4495	1.7331
0.3M/3小时	14.12	7.02	3.0854	1.9651
0.3M/4小时	9.06	4.91	3.3819	1.8263
0.3M/5小时	8.69	3.49	4.0581	1.7320
0.4M/3小时	9.62	4.16	3.2071	1.8896
0.4M/4小时	8.74	3.94	5.3658	2.1890
0.4M/5小时	7.69	3.24	5.4971	2.4762
0.4M/6小时	9.49	2.52	7.9043	2.5766

[0108] 体外降解特征

[0109] 通过在SBF中温育来体外测试根据跟本公开制备的具有各种氧化度的经照射的氧化纤维素和未经照射的氧化纤维素的样品。降解特征表明,纤维素样品在至少2-4周的时间段内保持为机械稳定的(呈隔膜/膜的形式)。在初始时间段之后,样品开始分解成不规则的纤维素块并且在接下来的1-3个月内降解,由此留下其初始干燥质量的大约0.1%-5.0%。

[0110] 进行实时的和加速的研究。将干燥的经照射的氧化纤维素的样品(大约1×1平方厘米)放置在填充有20ml SBF(pH=7.4)的无菌50ml离心锥形管中并且在37℃或55℃的静态条件下保持1周至6个月的时间段(实时)。对于此实时研究而言,在最初5天内每天并且随后每周通过离心样品、滗析老SBF、并且利用新SBF替换老SBF来更换每个管中的SBF。在1、2、3、4、14、28、90和164天对样品进行分析。在每个时间点,对管进行离心以收集残余的粒料。对上清液进行滗析,并且添加DI水以洗涤得自残余SBF的粒料。简单地搅动管并且对管进行再次离心以收集粒料。将DI水洗涤步骤重复两次。然后将粒料在60℃的烘箱中干燥到恒重。降解百分比被计算为干燥粒料重量和初始样品重量之间的差值。

[0111] 图8以图形方式示出了在不同高碘酸盐浓度下氧化的经照射的纤维素的降解特征(SBF;pH=7.4,55℃,7天)。针对所测试的全部条件,观察样品的干燥质量在整个研究中的逐渐损失。一旦在SBF中温育,样品就变成具有高半透明度的较软、凝胶状结构。根据所用的氧化条件,在7天温育时间之后可获得约10%-95%的降解范围。结果表明,降解速率与氧化度有关,所述氧化度可由高碘酸盐浓度、反应温度、和反应时间来控制。可通过使用此类方法制备具有所需降解速率的相适应的且机械稳定的生物材料。图9以图形方式示出了氧化各个时间段(1-4小时)的经照射的纤维素样品和未经照射的纤维素样品的体外降解(干燥质量损失)的结果。曲线表明,氧化3小时和4小时的这两种类型的样品均存在重量损失。对于氧化小于约3小时的样品而言,经照射的纤维素的质量损失的初始速率大于未经照射的纤维素。

[0112] 将用于体外降解中的各种类型的纤维素样品提交给Polymer Solutions Incorporated(PSI)(Blacksburg,VA)以利用具有光散射检测的GPC来分析分子量分布。提交三种类型的样品:1)天然微生物纤维素样品,被标示为“天然纤维素(润湿)”;2)经照射的

氧化微生物纤维素样品,被标示为“氧化纤维素(润湿)”;和3)已经受如上所述的七天体外降解过程的经照射的氧化微生物纤维素的残余样品,被标示为“植入物残余成分”。

[0113] 如此实验中所用,术语“润湿”用于指示“天然纤维素”样品和“氧化纤维素”样品均未经受利用此前所述的超临界CO₂进行临界点干燥的步骤。“氧化样品”和“植入物残余成分”样品均是在0.3M高碘酸盐、40℃、3小时的条件下进行氧化的。

[0114] 利用具有光散射检测的凝胶渗透色谱法(GPC)来分析纤维素样品的分子量分布。将4×5cm天然纤维素片(润湿)的大约一半以及整个2.2×3.0cm氧化纤维素片(润湿)分别放置在单独的40-mL玻璃闪烁小瓶中。将一片Whatman#1滤纸在小叶片型磨咖啡机中研磨约5分钟,并且称取大约20mg所得的“绒毛”放入40-mL闪烁小瓶内中。Whatman滤纸被包括在内以作为溶解过程的对照物并且还可用于估计纤维素在DMAc中的具体折光指数增量(dn/dc)。将10mL纯水和一次性搅拌棒添加到每个小瓶中。将每个瓶在50℃下搅拌大约5个小时。天然纤维素(润湿)和氧化纤维素(润湿)样品并未破裂。因此,将润湿的纤维素片放置在具有60至70mL纯水的小型食物加工机中并且处理60至90秒,由此获得极小纤维颗粒的浆料。然后将浆料在47-mm0.2-μm尼龙隔膜上进行真空过滤,直至过量的水恰被移除。

[0115] 然后将润湿的纤维素样品转移到Whatman Vecta-Spin离心过滤器(其包括10-μm聚丙烯网片过滤器)。将水进行离心脱出并且利用HPLC级甲醇进行置换和浸泡过夜。第二天,旋出甲醇,并且利用新甲醇进行另外的3小时浸泡,随后执行20分钟的离心。然后利用干燥的N,N-二甲基乙酰胺(DMAc)来重复溶剂交换过程,共计执行3次交换,每次交换的浸泡时间分别为75分钟、过夜和30分钟,并且在每次浸泡之后执行20分钟的离心。

[0116] 然后将DMAc润湿的样品和Whatman滤纸对照物转移到40-mL闪烁小瓶中。同样称取20mg的植入物残余成分样品放入40-mL闪烁小瓶中。对于这些瓶中的每一个,添加2mL氯化锂在DMAc中的8%溶液和搅拌棒。将样品在室温下搅拌3天并且随后在4℃的冷藏机中再放置三天。天然纤维素和Whatman滤纸对照物为完全溶解的。氧化纤维素样品形成具有多个凝胶状颗粒的浑浊溶液。植入物残余成分样品为大部分溶解的,但具有极少百分比的不会溶解的原始样品。

[0117] 利用14mL的DMAc稀释天然纤维素和氧化纤维素溶液。利用30mL的DMAc稀释Whatman纤维素对照物和植入物残余成分样品。将稀释的溶液在大约4℃下再储存一天,随后通过0.45-μm孔径的PTFE注射器式过滤器过滤到GPC自动采样瓶中。在过滤后,按照下表5中所列的参数来执行每个样品溶液的双份GPC注入并且利用双角度光散射来计算分子量。

[0118] 表5:

[0119]

参数	值
移动相:	DMAc中的0.5%LiCl
柱:	(2)Tosoh Alpha M,300×7.8mm
流速:	0.8mL/min
柱温:	50℃
检测器:	Visotek Triple Detector Array(TDA) _w /RI,7°和90°光散

[0120]

	射,&微分粘度检测器
--	------------

检测器温度:	50℃
注入体积:	200μL
摩尔重量计算方法:	双角度光散射
光散射/RI检测波长:	670nm
纤维素的dn/dc:	0.1309mL/g*

[0121] *—纤维素值的dn/dc是指用作对照值的棉布纤维素的值

[0122] 每个样品的双份注入的分子量平均值(M_n , M_w , M_z)和多分散性(M_w/M_n)呈现在表6中。比较全部样品的分子量分布曲线并且将其以图形方式示于图10中。针对Whatman滤纸对照物的双份注入由RI检测器峰面积来估计纤维素在DMAc中的具体折光指数增量(dn/dc)值(其用于光散射分子量计算)。细菌纤维素样品被假定为与Whatman滤纸(棉布纤维素)具有相同的dn/dc值。

[0123] 表6:

[0124]

样品	GPC周期	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	M_z (g/mol)	M_w/M_n
天然纤维素 (润湿)	1	27,047	87,951	187,092	3.25
	2	26,383	88,598	194,792	3.36
	平均值	26,715	88,275	190,942	3.30
	标准偏差	470	457	5,445	0.08
氧化纤维素 (润湿)	1	22,598	75,899	216,679	3.36
	2	22,633	76,687	248,783	3.39
	平均值	22,616	76,293	232,731	3.37
	标准偏差	25	557	22,701	0.02
植入物残余 成分	1	17,134	43,602	89,334	2.54
	2	21,227	46,578	93,085	2.19
	平均值	19,181	45,090	91,210	2.37
	标准偏差	2,894	2,104	2,652	0.25
Whatman #1 滤纸(对照物)	1	289,819	476,627	678,373	1.64
	2	295,673	472,848	680,254	1.60
	平均值	292,746	474,738	679,314	1.62
	标准偏差	4,139	2,672	1,330	0.03

[0125] 辐射剂量和体外降解

[0126] 使四个纤维素主体经受不同的辐射剂量并且随后在0.3M高碘酸盐、40℃、3小时的条件下进行氧化。在经受氧化之后,测量样品的体外降解速率(7天)。

[0127] 将纤维素主体发送到Sterigenics(Charlotte, NC)以经受各种剂量下的辐射曝光。利用ExCell[®]系统、高精度、小体积辐射器并且经由γ辐射来照射样品。每次辐射曝光旨在于约20kGy至约26.5kGy的剂量范围内照射样品。用于每次处理的实际剂量水平经测量为约23kGy。其后,将样品在40℃下利用0.3M高碘酸盐氧化三小时。图11为辐射曝光和后续氧化之后的四个样品的顶视图。样品1(41)为未经照射的。样品2(42)暴露于剂量为23kGy的一次处理。样品3(43)暴露于每次剂量为23kGy的两次处理。样品4(44)暴露于每次剂量为23kGy的三次处理。按照此前所述的方式测量样品在SBF条件以及55℃下保持一周时的体外降解。表7示出了每个样品在SBF条件下保持一周之后测得的样品降解百分比,以及体外降

解测试开始之前的样品重量、表面积和纤维素含量。

[0128] 表7

[0129]

样品	降解 (7天)	重量 (g)	表面积 (cm ²)	纤维素含量 (10 ³ g/cm ²)
未经照射的	71%	0.0522	2.7	19.3
单次照射的	71%	0.0629	3.6	17.0
两次照射的	70%	0.0222	5.5	4.0
三次照射的	71%	0.0202	7.2	2.8

[0130] 尽管增加的辐射可影响样品在氧化之后的干燥重量和尺寸,如图11所示,但总体降解不存在相应的变化,如在表7中可见。尽管不受任何具体理论的约束,但据信,辐射可能导致在测试样品中发生两件事情:(1)由于自由基的形成而产生断链,这可降低纤维素的平均分子量,以及(2)自由基促进纤维素结构中的交联。因此,尽管断链可能为显性机制,但具有变化几何形状的小交联分子的形成也可能为显性机制,这可防止发生进一步地降解。

[0131] 同样,尽管不受任何具体理论的约束,但据信,纤维素样品因暴露于增加的辐射而产生的分子量减小可导致增大尺寸的氧化纤维素样品,如图11所示。此外,因辐射产生的任何断链降低了纤维素链的长度,从而防止样品在氧化期间的收缩。具有较长链长度的未经照射的纤维素样品有可能受到氧化工序的影响。

[0132] 体内研究

[0133] 体内研究评估根据本公开的四个经照射的氧化纤维素植入物(被标示为TD1-TD4)(每个植入物具有不同的氧化特征)的体内降解速率和安全性/生物相容性,并且将它们与1)可商购获得的交联牛肌腱胶原(被标示为CD1)、和2)天然微生物纤维素(被标示为CD2)进行比较。根据本公开的四个植入物的氧化特征如下:TD1具有在0.4M高碘酸盐、40℃、3小时的条件下进行氧化的55%氧化特征;TD2具有在0.4M高碘酸盐、40℃、4小时的条件下进行氧化的84%氧化特征;TD3具有在0.3M高碘酸盐、40℃、3小时的条件下进行氧化的50%氧化特征;并且TD4具有在0.3M高碘酸盐、40℃、5小时的条件下进行氧化的94%氧化特征。用于体内研究中的所有TD样品在氧化之前根据本文所述的方法进行照射。

[0134] 将十七个新西兰白色公兔(16个研究动物+1个备用动物,根据研究方案)引入到此研究中。将16个研究动物分配给四个组中的一个,其中每个组具有四个动物。将植入物全部通过皮下植入方式植入到兔子模型中并且在植入之后2周、4周、12周、和26周时进行评估。每个动物接收六种材料中的每一种,所述六种材料植入到兔子背部的单独皮下袋种(背部中线每侧植入三种材料)。根据预先确定的植入模型,每只兔子中的每个不同植入物的位置为无规的。钝切浅筋膜以与下面组织分离,由此产生足够深的皮下袋以容纳测试装置或对照装置(天然微生物纤维素和吸收性胶原)。在每个测试装置或对照装置已得以定位之后,将一对缝皮钉用于标记装置的位置并且放置在最靠近切口部位的测试装置或对照装置的两个角处,但不与材料相关联。使用一对4-0聚丙烯缝合线将植入物缝合到下面的皮下组织,以便防止植入之后的植入物迁移。

[0135] 将四只兔子处死并且在如下四个不同时间点中的一个处进行受限的尸检:植入手术之后2周、4周、12周或26周。尸检限于植入部位和植入物周围组织的肉眼观察,且具有受

限的组织标本(包括得自由植入物周围组织围绕的植入物的手术部位的标本)。每个部位处的植入物在每个测量时间段(2周、4周、12周或26周)的降解被记录并且分别示于下表8-12中。

[0136] 表8:2周

[0137]

终期评价 ^a	TD1	TD2	TD3	TD4	CD1	CD2
	2周	2周	2周	2周	2周	2周
炎症 ^b	0.75	1.25	0.75	0.50	0.00	0.00
感染 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
纤维变性 ^b	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00
血清肿 ^b	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00
血肿 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
显著血管生成 ^b	1.25	1.00	0.50	0.75	0.00	0.00
植入物的存在 ^c	1.00	1.00	1.00	1.00	0.25	0.00
植入物降解 ^d	2.50	2.50	2.50	2.75	0.25	0.00
植入物测量 ^e	27.0	65.3	25.0	47.0	91.8	145.0
剩余的原始植入物面积%	17.3	41.8	25.0	37.6	58.7	92.8

[0138] 表9:4周

[0139]

终期评价 ^a	TD1	TD2	TD3	TD4	CD1	CD2
	4周	4周	4周	4周	4周	4周
炎症 ^b	1.25	1.25	1.25	1.75	0.00	0.00
感染 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
纤维变性 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
血清肿 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
血肿 ^b	0.00	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00
显著血管生成 ^b	0.75	0.25	0.50	0.50	0.00	0.00
植入物的存在 ^c	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	0.00
植入物降解 ^d	2.50	2.75	2.50	2.75	0.75	0.00
植入物测量 ^e	15.5	17.8	11.0	29.5	49.5	94.0
剩余的原始植入物面积%	9.9	11.4	11.0	23.6	31.7	60.1

[0140] 表10:12周

[0141]

终期评价 ^a	TD1	TD2	TD3	TD4	CD1	CD2
	12周	12周	12周	12周	12周	12周
炎症 ^b	1.00	0.75	0.75	0.50	0.00	0.50
感染 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
纤维变性 ^b	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.50
血清肿 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
血肿 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
显著血管生成 ^b	0.50	0.75	1.25	0.75	0.25	1.25
植入物的存在 ^c	1.00	1.00	1.00	1.00	1.75	0.00
植入物降解 ^d	3.00	2.75	3.00	3.00	3.50	0.00
植入物测量 ^e	7.0	47.3	30.0	42.0	9.5	120.8
剩余的原始植入物 面积%	4.5	30.2	30.0	33.6	6.1	77.3

[0142] 表11:26周

[0143]

终期评价 ^a	TD1	TD2	TD3	TD4	CD1	CD2
	26周	26周	26周	26周	26周	26周
炎症 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
感染 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
纤维变性 ^b	0.25	0.25	0.38	0.25	0.00	0.38
血清肿 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
血肿 ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
显著血管生成 ^b	1.00	0.75	0.88	1.00	0.00	1.00
植入物的存在 ^c	1.25	1.25	1.25	1.50	2.00	1.00
植入物降解 ^d	3.25	3.25	3.25	3.50	4.00	1.00
植入物测量 ^e	5.8	19.0	22.5	0.0	0.0	53.5
剩余的原始植入物 面积%	3.7	12.2	22.5	0.0	0.0	34.2

[0144] a平均分数

[0145] b评分:0=无;1=轻度;2=中度;3=重度

[0146] c评分:0=材料以植入时的形式存在1=材料存在,但具有降解的迹象2=材料不存在

[0147] d评分:0=与植入时相同1=轻度碎裂;2=中度碎裂;3=重度碎裂;4=无法评分

[0148] e以平方毫米(mm²)计算的植入物测量值

[0149] 对照植入物未显示出任何值得注意的炎症。两周之后,一些值得注意的显著炎症出现在全部测试材料植入物周围,其中最低程度出现在TD4周围。四周之后,所有测试材料部位处的炎症轻度地增加,其中在TD4周围观察到最严重的炎症。12周时,所有部位处的炎症类似于两周时的观察结果,其中在TD4周围观察到最低程度。26周时,未在任何植入物周围观察到炎症。在任何时间点均未观察到感染。一个动物中的TD2植入物部位被注意到具有

可能的感染,但用显微镜检查时,不存在感染迹象或菌落迹象。在任何植入物周围显著地观察到极少的甚至未观察到纤维变形,例外情况可能出现在12周之后的天然微生物纤维素植入物周围。26周时,在所有植入物周围观察到轻度纤维变性,例如情况是交联的牛肌腱胶原,因为纤维变性不存在。两周时,在一个动物中的TD2植入物部位周围似乎存在小的血清肿。其他部位在任何时间点均不包括血清肿。

[0150] 两周之后,一个动物在TD2植入物部位附近具有可以分辨的血肿的迹象,并且两个动物具有与TD4植入物相关的可以分辨的血肿的迹象。这些迹象可能由外科手术自身引起。四周之后,在一只兔子的CD1植入物部位处、在另一个动物的TD2部位处、在一个动物的TD3部位处、并且在另一个动物的TD4部位处出现小血肿。在所有情况下,这些血肿可能因放置的加强缝合线而产生。在12周或26周时均未观察到血肿。

[0151] 显著血管生成(慢性炎症的迹象)在早期时间点处也极少观察到,但在12周和26周时间点处往往会增加,且在后一时间点处最明显。2周时,最显著的血管生成出现在TD1植入物周围并且最不显著的血管生成出现在TD3植入物周围。2周和4周时,在对照植入物周围未观察到显著血管生成,但在12周之后,尤其是在天然微生物纤维素植入物周围明显地出现显著血管生成。交联的牛肌腱胶原和所有的测试材料植入物部位在12周之后也显示具有一些显著血管生成。26周时,显著血管生成大致同样地出现在所有部位处,例外情况是交联的牛肌腱胶原部位,该部位处不存在显著血管生成。

[0152] 测试材料TD1的代表性尸检图像示于图12A-F中。图12A示出了刚刚放置固定在皮下袋中之后的处于第一刚性状态的植入物的实施例。放置之后,植入物通过从周围组织吸收水分而迅速地转变成第二水合状态,并且随后与组织表面相适应且附着到组织表面,如图12B所示。应该指出的是,在水合之后,植入物显示出半透明度,并且几乎无法与下面组织进行区分。图12C示出了植入2周之后的植入物,其中植入物为显著较薄的。图12D示出了植入4周之后的植入物,其中植入物为中度降解的,且剩余相当大的一片。图12E示出了植入12周之后的植入物,其中植入物为重度降解的,存在组织变色,并且剩余的降解植入物部分为极其扩散和极薄的。图12F示出了植入26周之后的植入物,其中植入物为重度降解的;剩余的植入物部分为极其扩散和极薄的。加强缝合线为可见的,并且箭头指示散布的小变色区域,所述小变色区域可指示剩余TD1植入物材料的碎片。

[0153] 天然微生物纤维素植入物在整个研究期间未显示出降解迹象。另一方面,交联的牛肌腱胶原在2周时显示出一些降解,在4周时显著降解,并且在12周和26周时为基本上不存在的。所有的测试装置在所有时间点处均显示出显著的降解,但令人感兴趣的是,尽管它们初始似乎快速地降解,但它们不能持续保持如此快速地降解。体内研究表明,在两周时,TD1和TD3似乎显示具有最快速的降解。在四周之后,TD1、TD2和TD3的降解为类似的,而TD4显示出较低的降解。12周时,TD2、TD3和TD4的降解为类似的,而TD1与任何其他测试装置相比显示出显著较高地降解。26周时,交联的牛肌腱胶原均不存在,所有测试装置的一些残余物(呈组织变色的形式)仍存在,并且天然微生物纤维素仍以植入时的形式存在。

[0154] 对于此前在上述体内研究中以及在加速体外降解研究中测试的样品(TD1-TD4)而言,观察到相似的特性。TD1-TD4相对于强生 Surgicel[®] 的对照样品的体外研究表明,经照射的氧化纤维素样品当在55℃的SBF(pH=7.4)中温育第一个48小时期间具有极快速的降解。

图13以图形方式示出了体外研究的降解结果。研究表明,对于TD1-TD4而言,此快速降解水平在72-96小时结束,从而形成平台。

[0155] 将从体内植入物部位收集的组织样品固定在10%中性缓冲福尔马林(NBF)中,获取穿过植入物部位的大致中心的部分并且将其嵌入在石蜡中。执行苏木精和伊红(H&E)染色和雪夫染色(PAS)。PAS染色用于评估醛(氧化纤维素)的存在。由两个认证的兽医病理学家来检查和审阅所有的载玻片。根据用于评估植入之后的局部生物效应的ISO10993(2007)、第6部分、附录E准则来执行测试装置和对照装置的组织响应的评估:包括对测试装置和对照装置的血管生成度、纤维变性、和免疫应答评分,以及对植入物部位处的组织的刺激程度评分。

[0156] 显微镜评估显示,TD1和TD4到12周时明显具有值得注意的材料损失,并且这在降解方面能与交联的牛肌腱胶原相比。TD2和TD3具有延迟的植入物损失,并且直到26周时间点才出现值得注意的损失。天然微生物纤维素植入物在整个研究期间显示出极少的甚至未显示出降解迹象。

[0157] 植入物材料的炎症应答与异物应答一致,特征在于可变数量的巨噬细胞、异物巨细胞以及极少至少量(1至2的评分)的中性白细胞。嗜酸细胞为不罕见的,并且浆细胞为极少看到的。纤维变性通常由狭窄至中等厚度的条带构成,例外情况是天然微生物纤维素,其在12周时出现围绕植入物的增加的纤维囊形成物。由总炎症应答(乘以2)、血管生成、和纤维变性病理评分的总和来计算总刺激评分。使用总刺激评分来确定刺激状态的下述严重程度等级:

[0158] -无刺激(0.0至2.9)

[0159] -轻度刺激(3.0至8.9)

[0160] -中度刺激(9.0至15.0)

[0161] -重度刺激(>15.0)

[0162] 每个测试装置在每个时间点的平均等级刺激评分是通过从每个测试装置减去CD1或CD2的平均刺激评分来计算的,并且是基于如ISO10993、第6部分、附录E(信息)“植入之后的局部组织效应的评估例子(Examples of evaluation of local biological effects after implantation)”中所述的用于组织评分的准则的。下表12和13分别示出了样品相对于对照CD1和CD2中的每一个的平均刺激评分。

[0163] 在所有测试材料的早期时间点处,TD4的炎症反应(包括巨噬细胞和巨细胞的数量)为最显著的。这些发现与极其快速吸收型材料一致。在12周和26周时,所有测试材料的巨噬细胞和巨细胞同样为显著的,但最高的评分见于TD2附近,并且对于TD3而言见于更小的范围。此发现可能指示这些材料的吸收速率比TD4材料更慢。

[0164] 将四个测试材料与对照植入物(天然微生物纤维素和交联的牛肌腱胶原)进行比较并且在2周、12周或26周时视为无刺激物或轻度刺激物。相比于天然微生物纤维素,TD1和TD4仅在4周时间点处被视为中度刺激物。

[0165] 表12:相对于CD1的TD1-TD4

[0166]

	TD1	TD2	TD3	TD4
2周	2.75	0.25	4.50	4.75

4周	2.75	0.5	0.00	6.50
12周	0.75	0.00	0.50	0.00
26周	2.75	8.50	3.50	1.50

[0167] 表13:相对于CD2的TD1-TD4

[0168]

	TD1	TD2	TD3	TD4
2周	0.25	0.00	2.00	2.25
4周	8.50	0.25	5.50	12.25
12周	5.00	2.25	4.75	3.75
26周	0.00	3.33	0.00	0.00

[0169] 尽管已根据若干实施例阐述了本公开,然而应当理解,在不脱离例如随附权利要求书所指示的本公开实质和范围的条件下,可对本文作出各种改变、替代及更改。因此,应当理解,本公开的范围不旨在被限于本文所述的工艺、制造、物质组合物、方法和步骤的具体实施例。例如,除非另外指明,否则以上根据一个实施例所述的各种特征可结合到其他实施例。此外,本领域的普通技术人员根据本公开将容易地理解,根据本公开可采用与本文所述的相应实施例执行基本上相同的功能或实现基本上相同结果的目前存在或今后将开发出来的工艺、制造、组成物、方法、或步骤。

[0170] 本领域的技术人员应当理解,可在不脱离随附权利要求书的广泛范围的条件下对本发明作出各种变型和更改。所述各种变型和更改中的一些已在上文中进行讨论,其他变型和更改对于本领域的技术人员而言将是显而易见的。

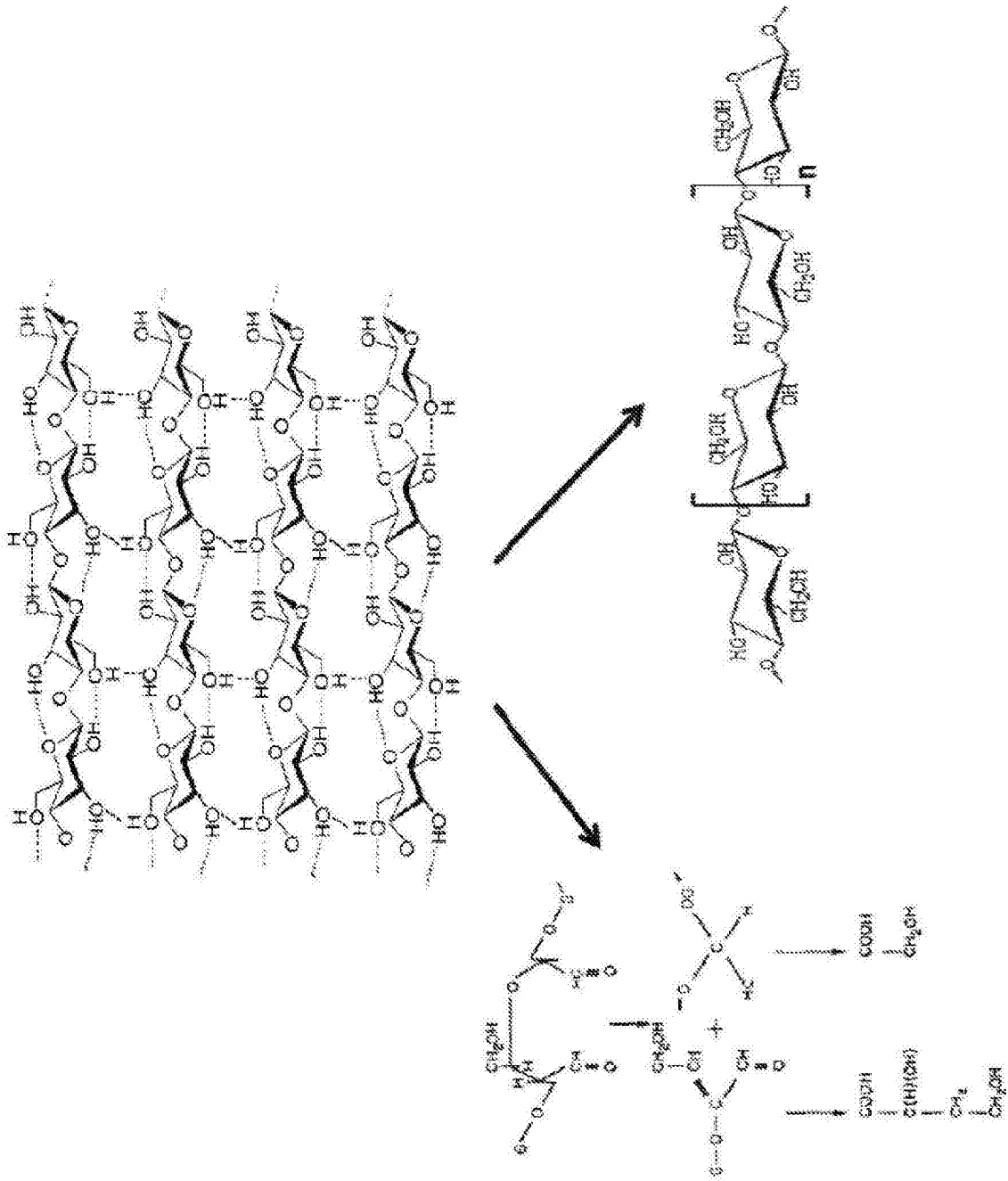


图1

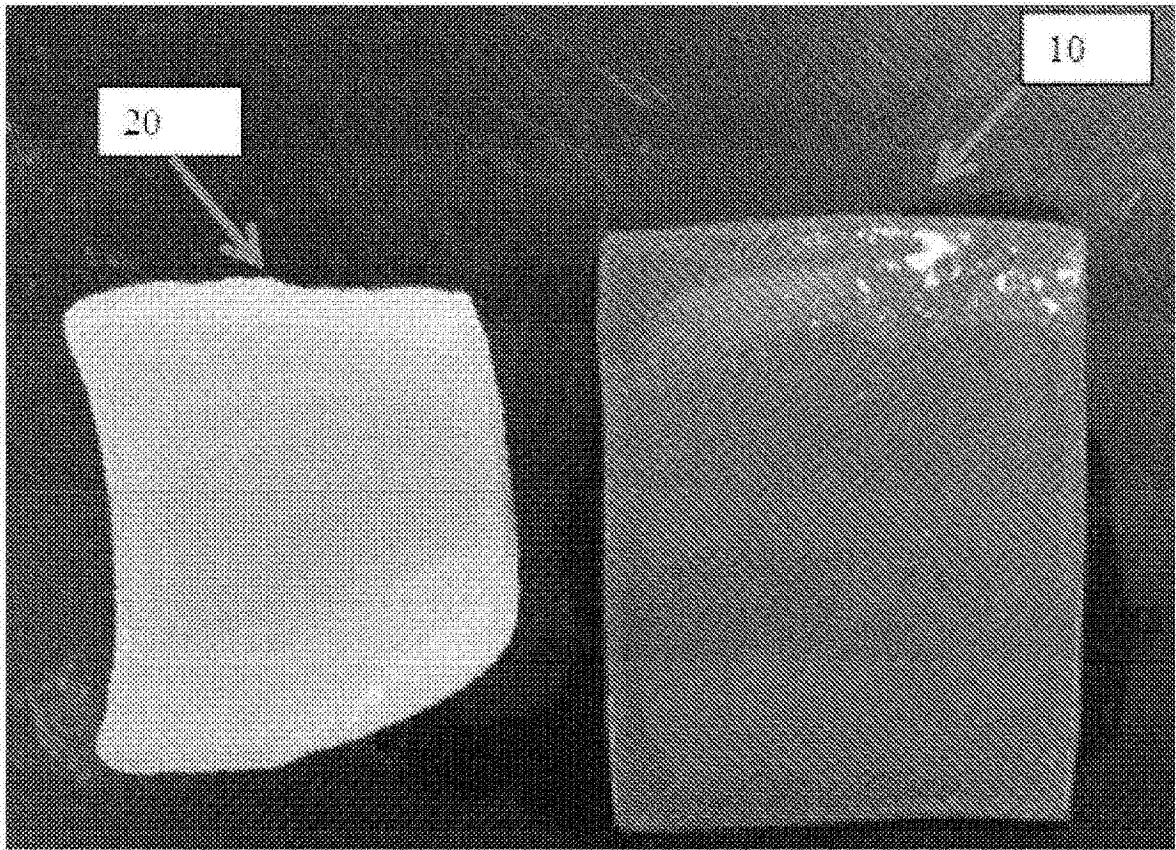


图2

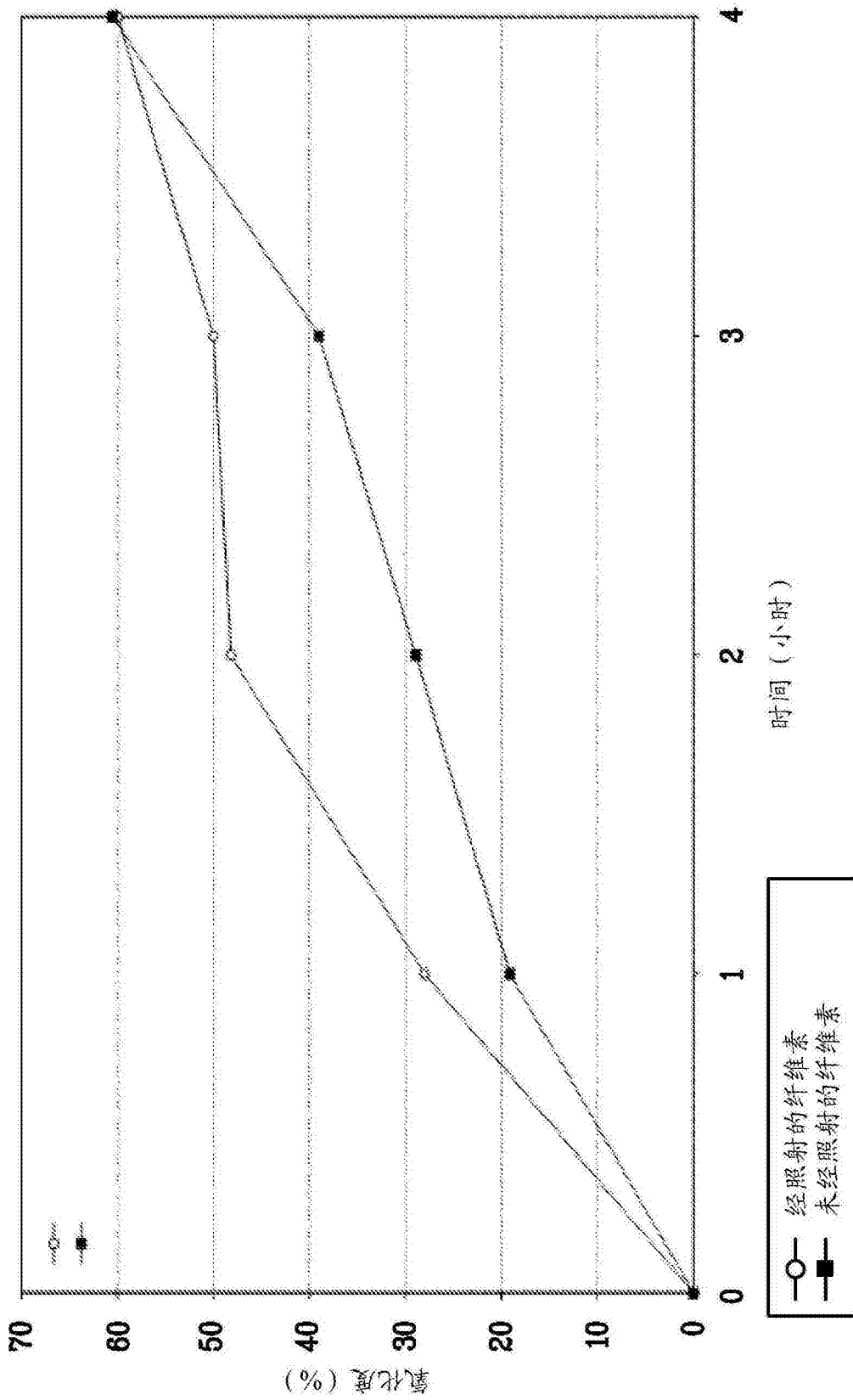


图3

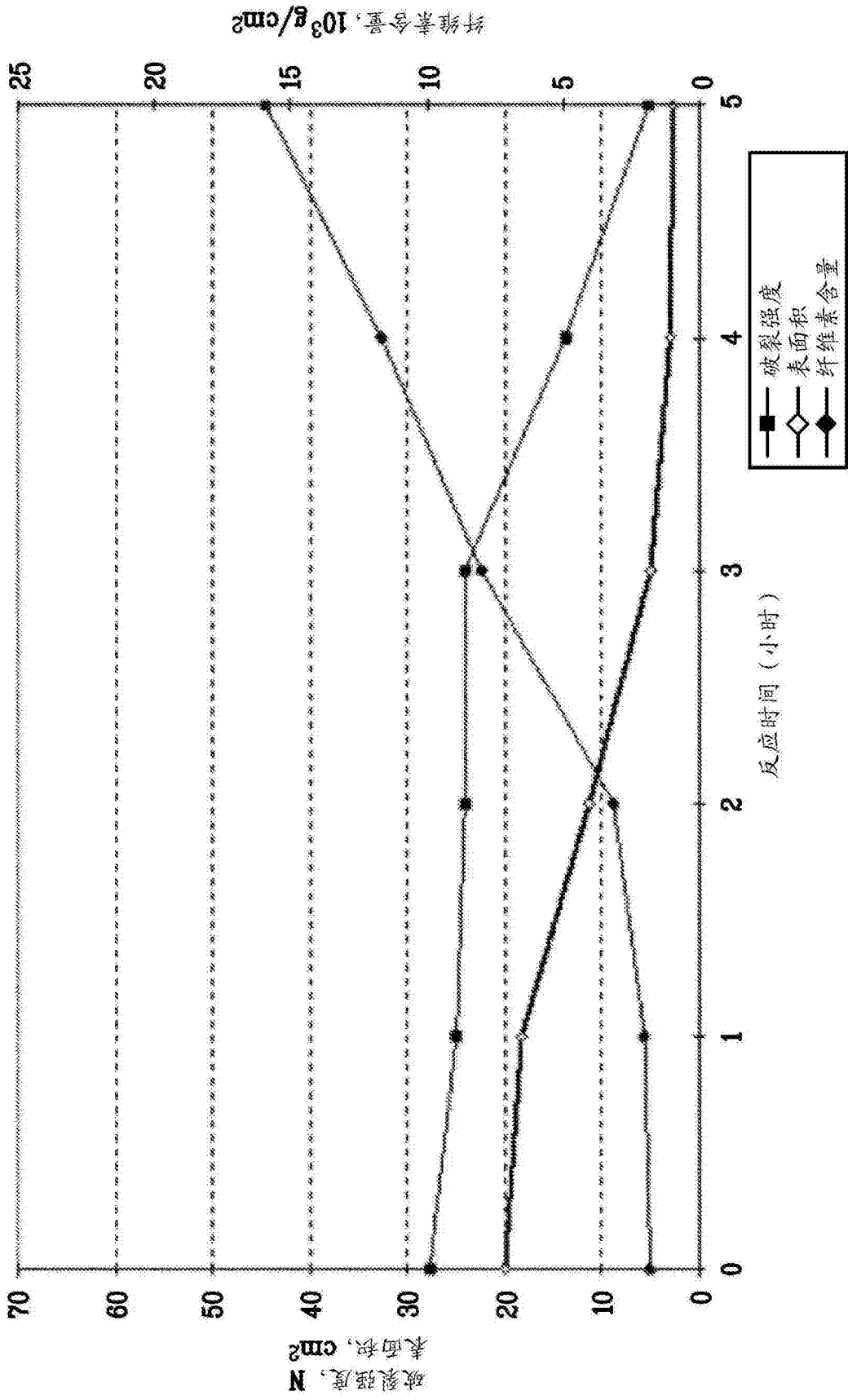


图4

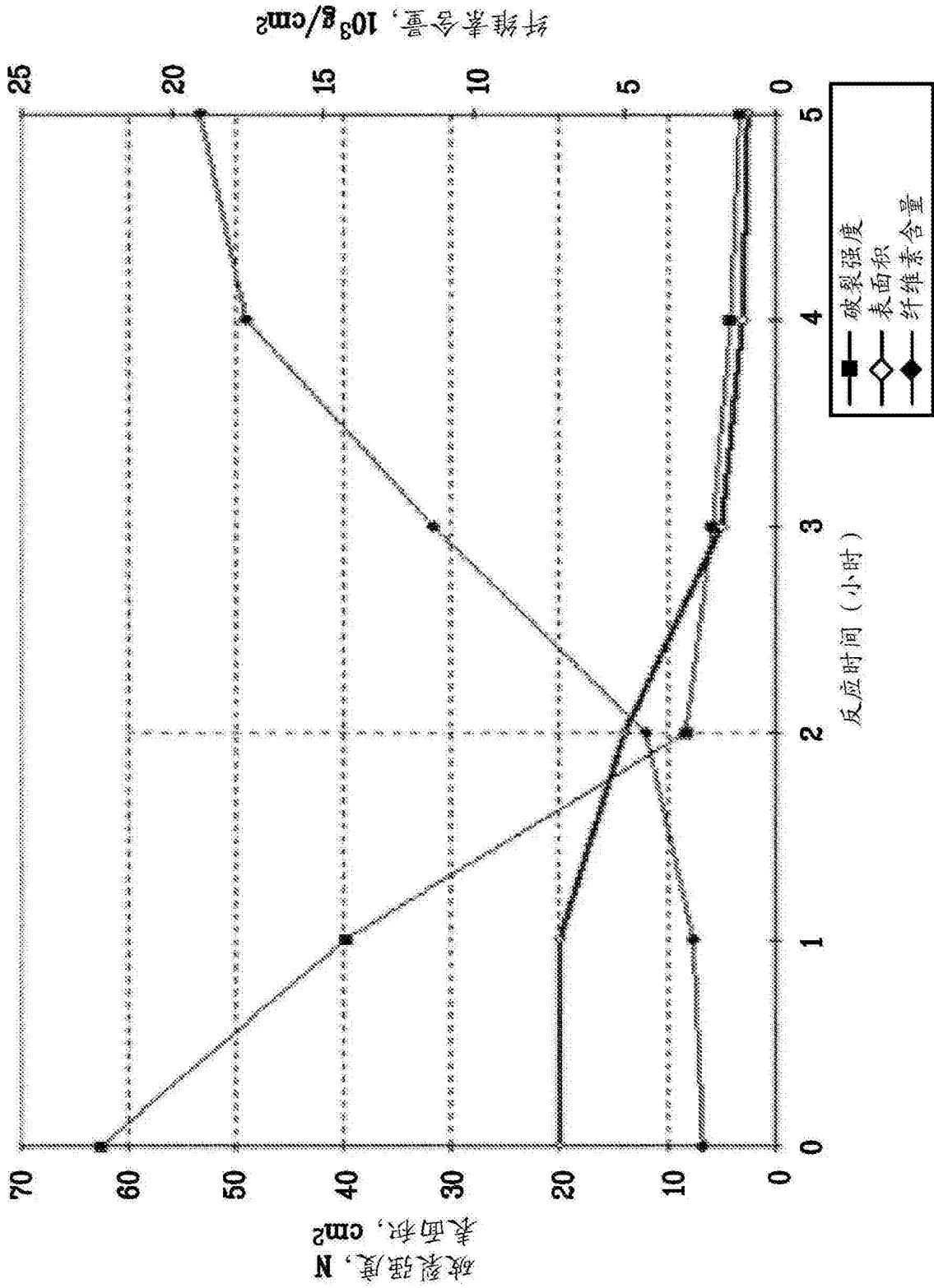


图5

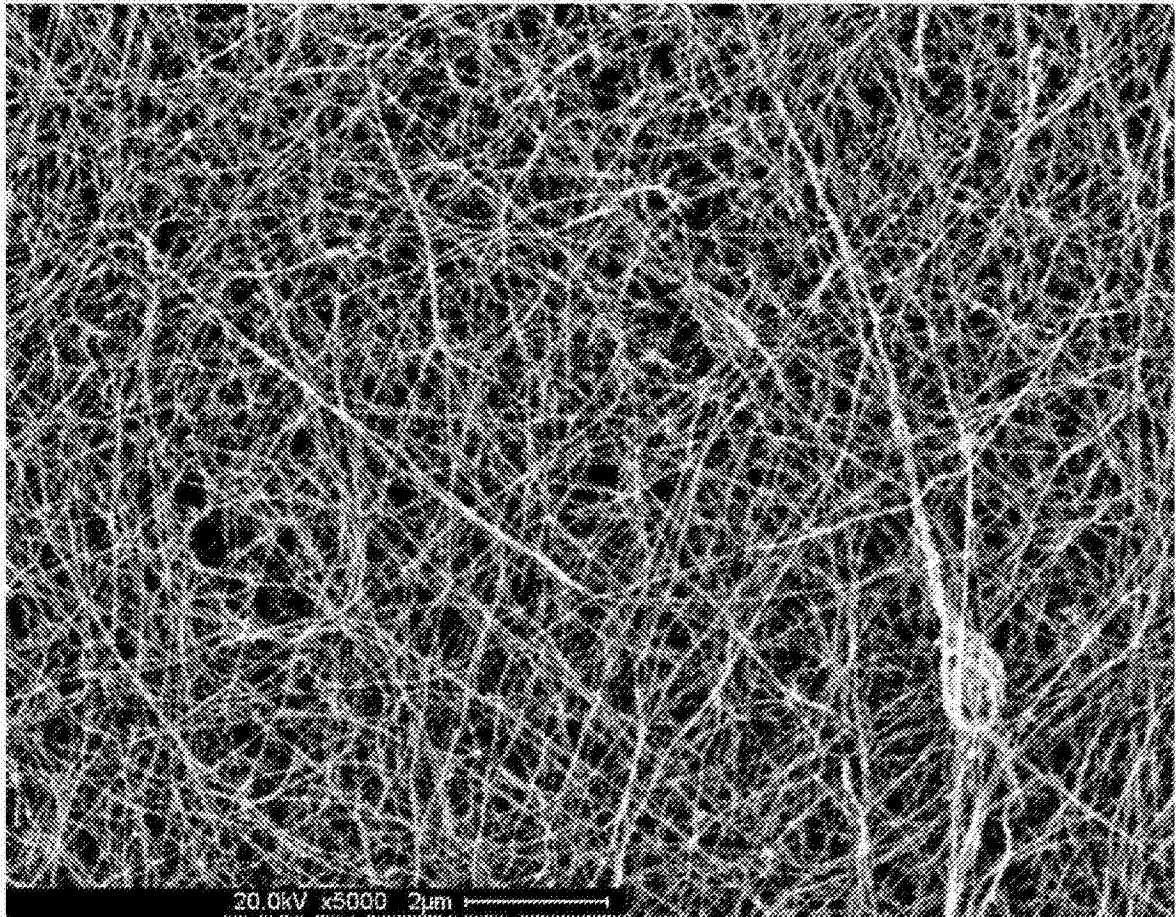


图6A

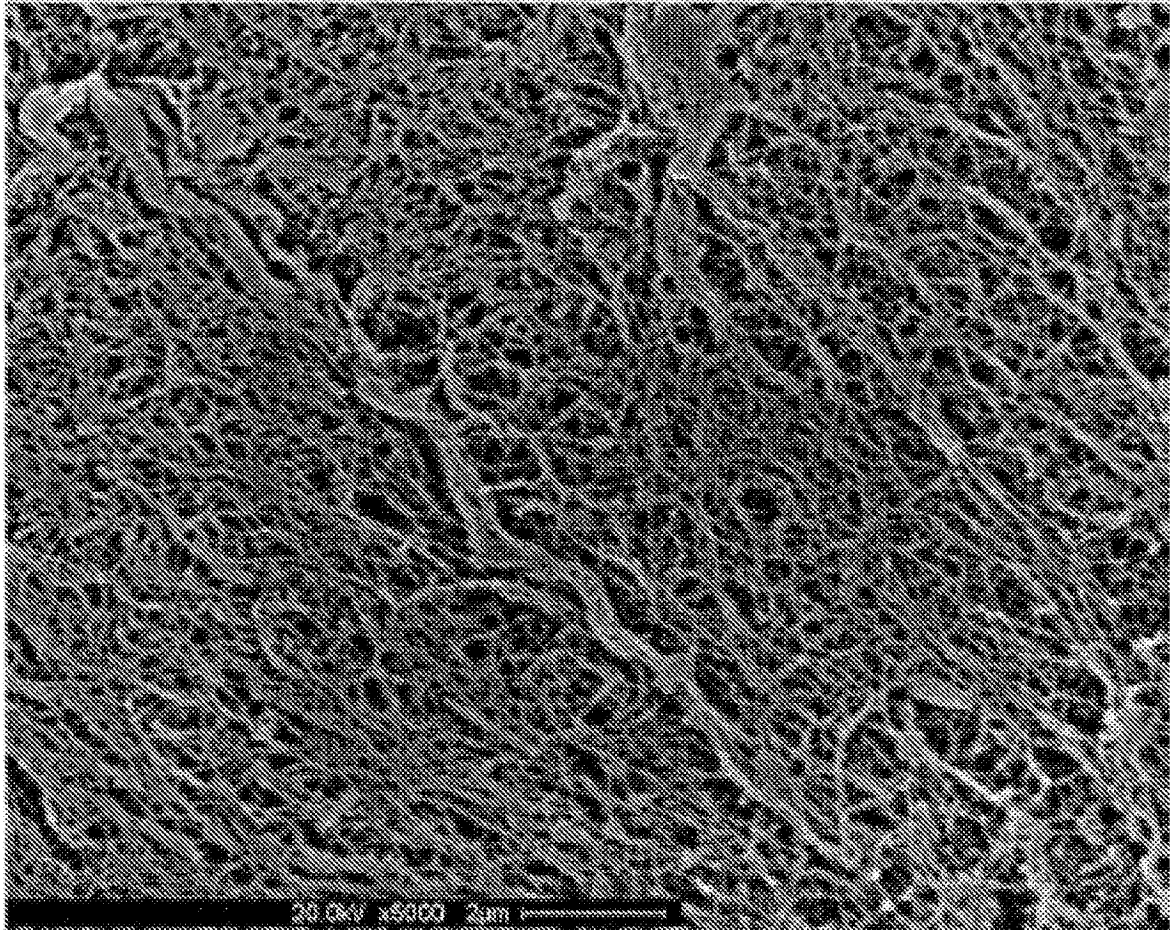


图6B

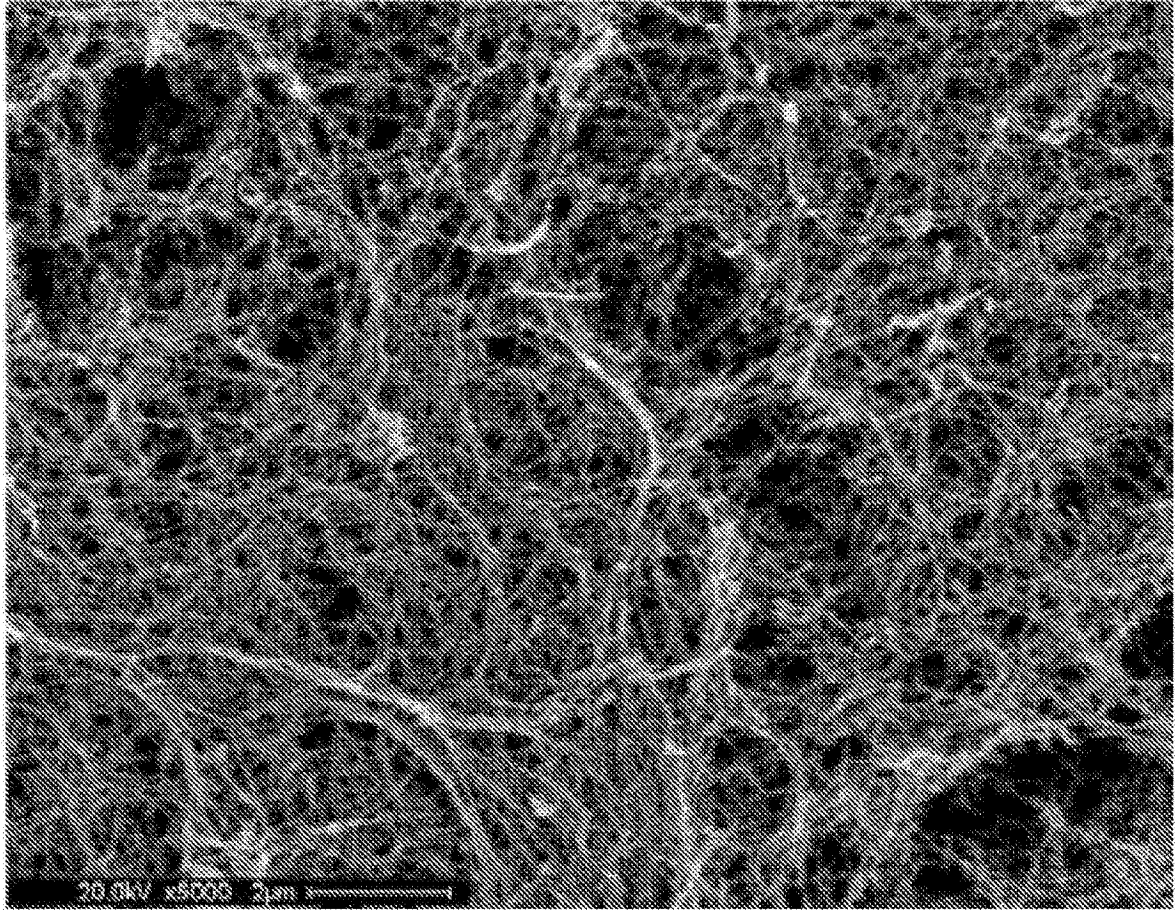


图6C

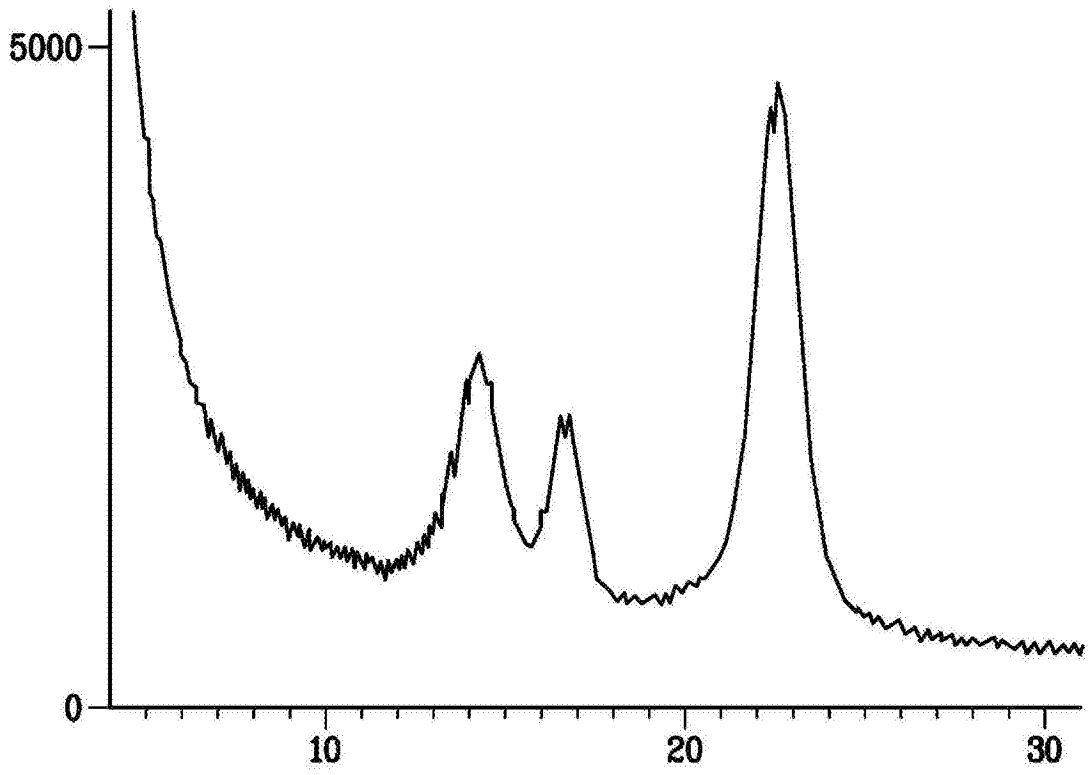


图7A

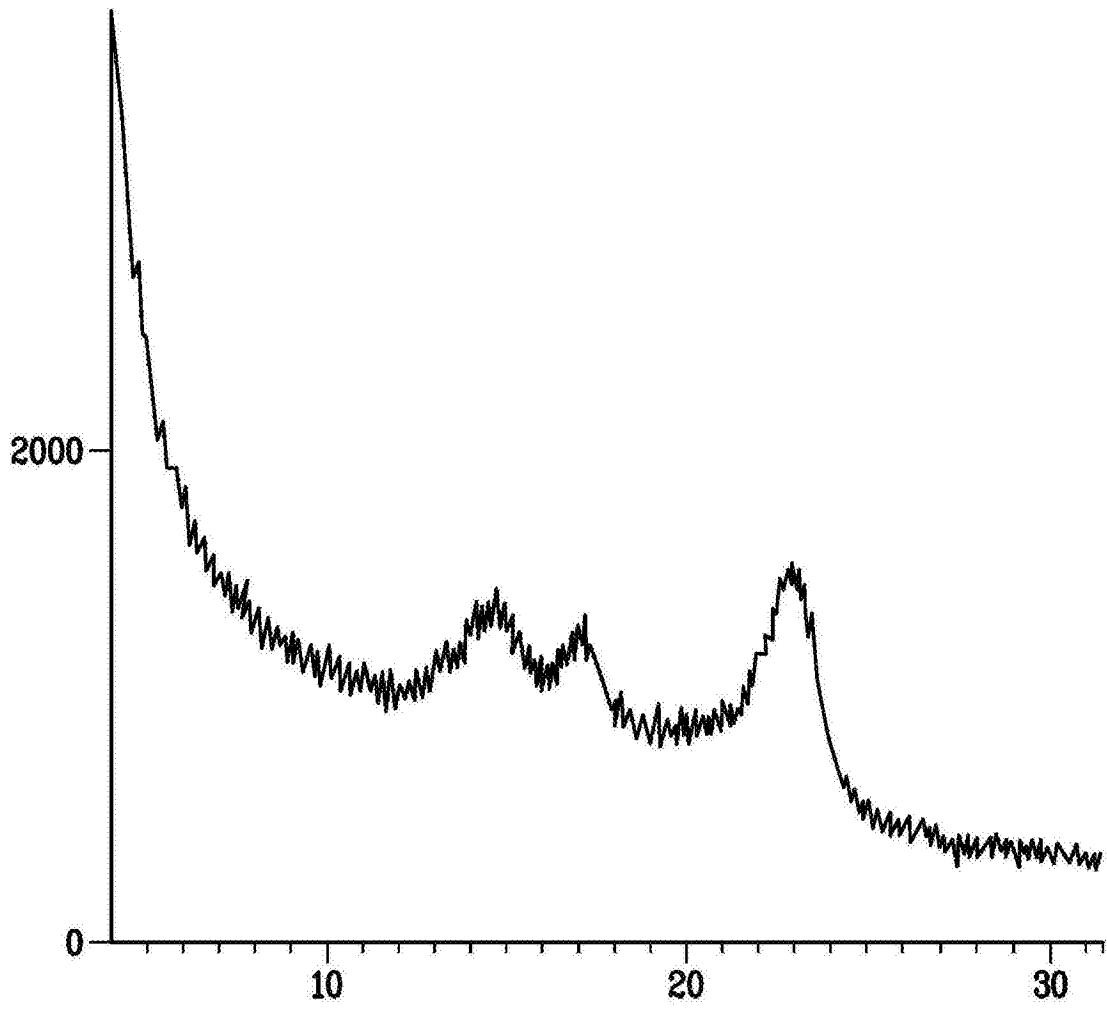


图7B

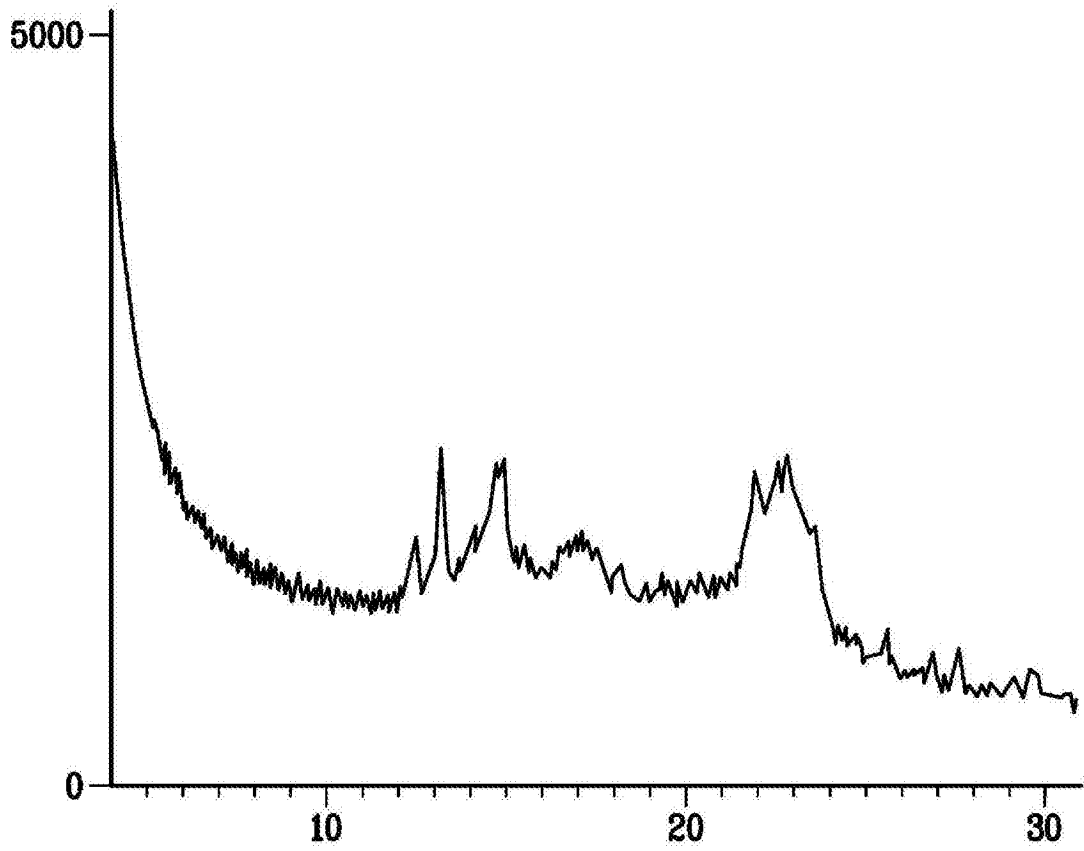


图7C

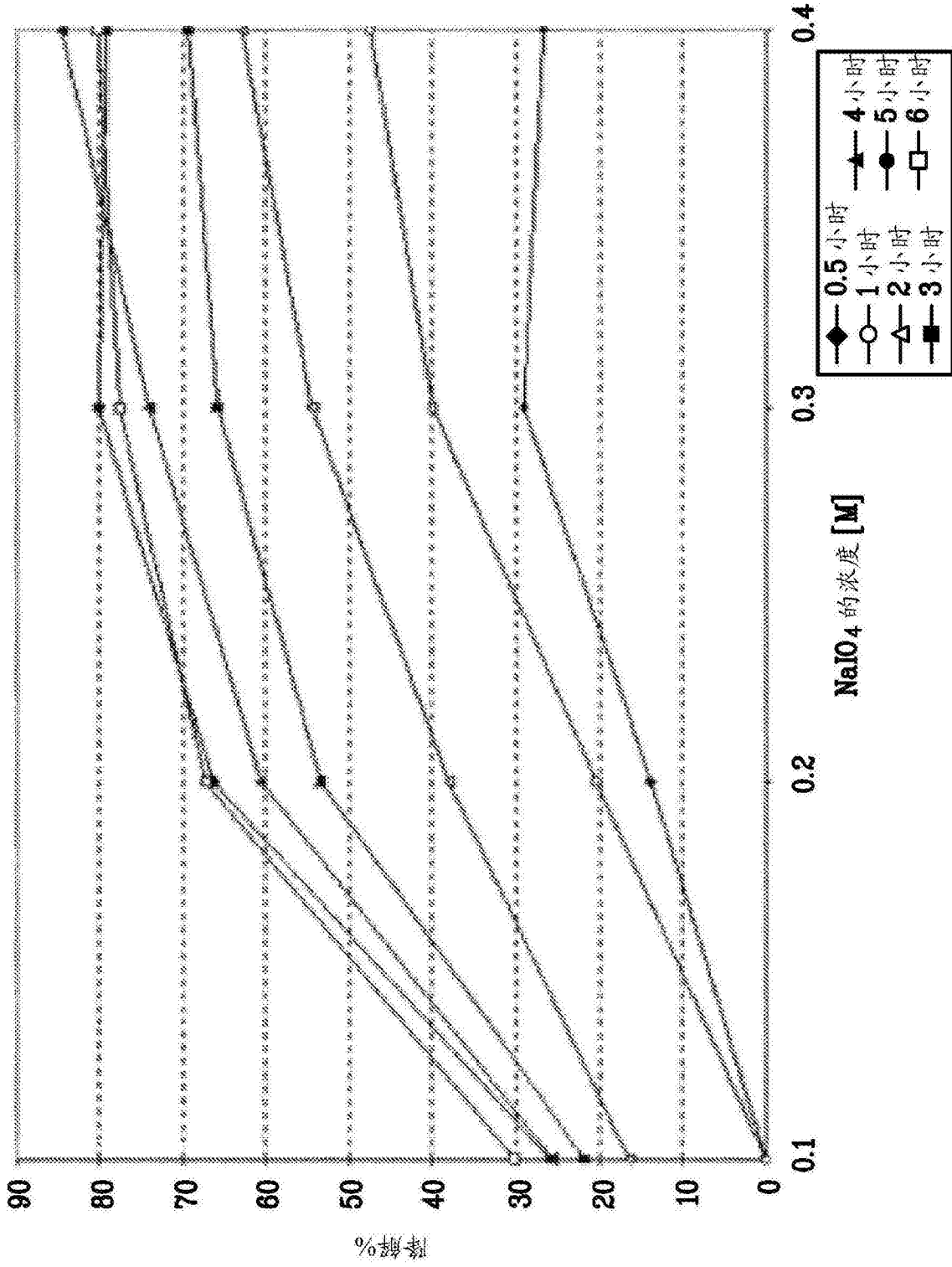


图8

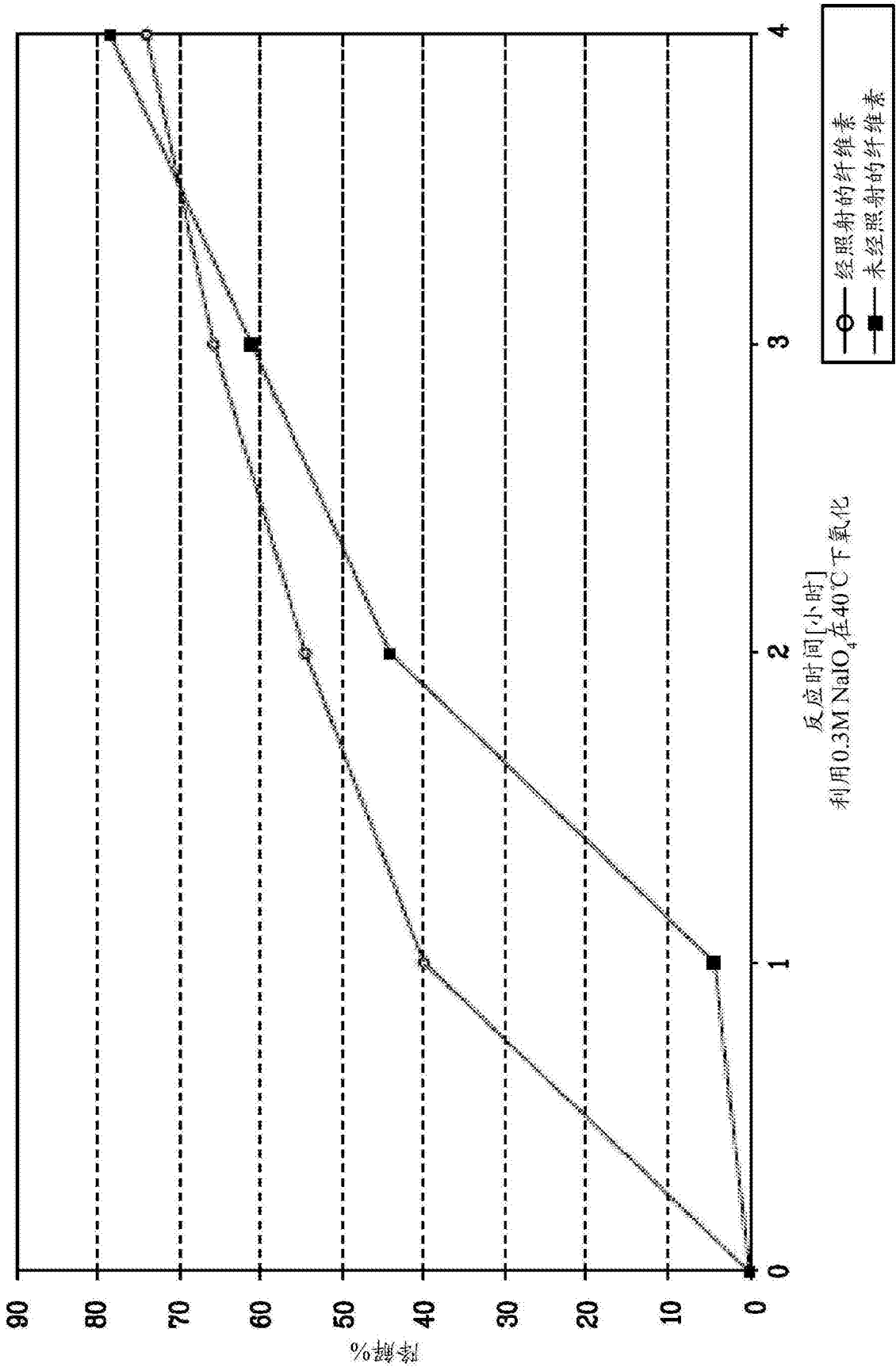


图9

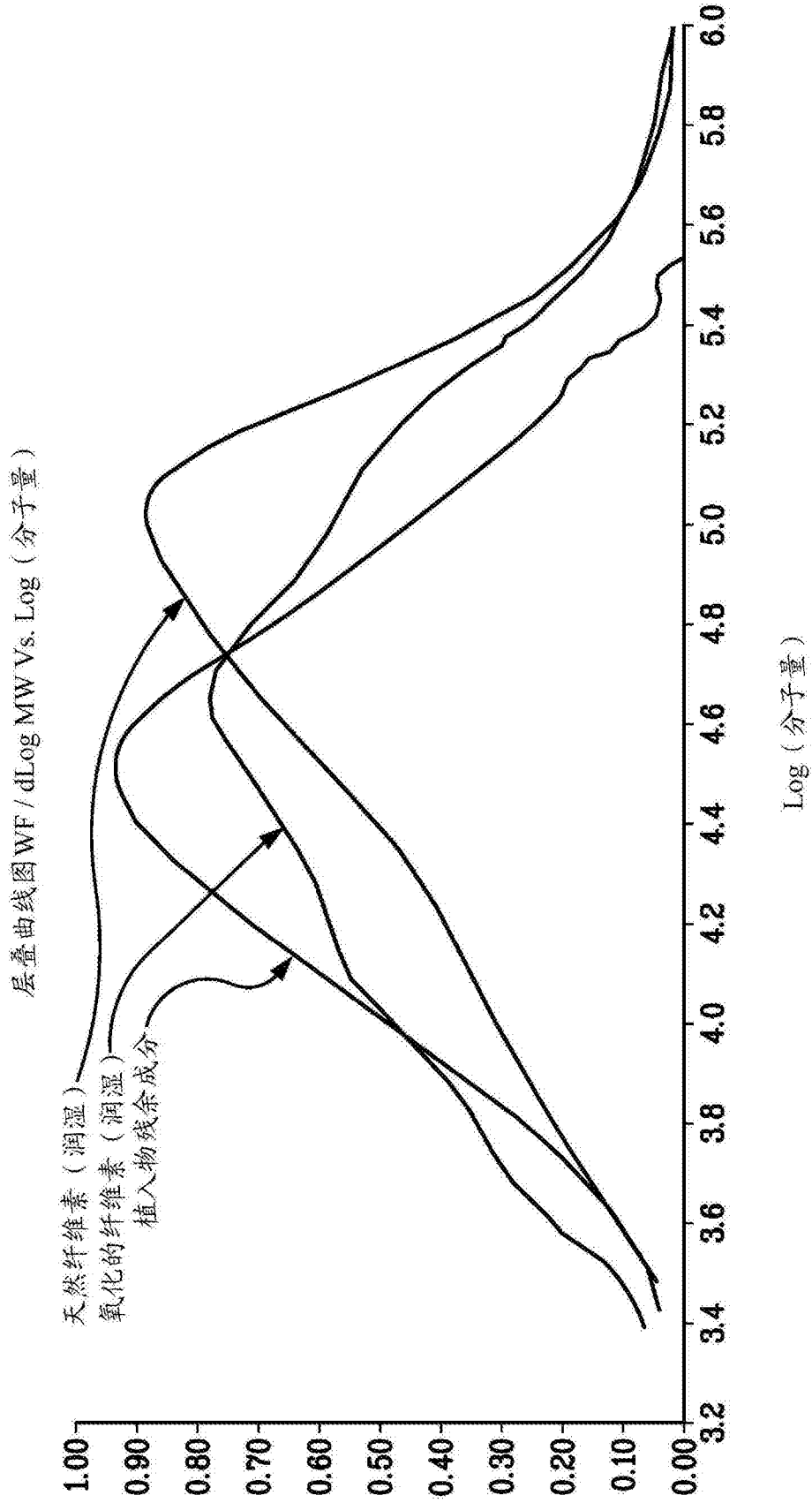


图10

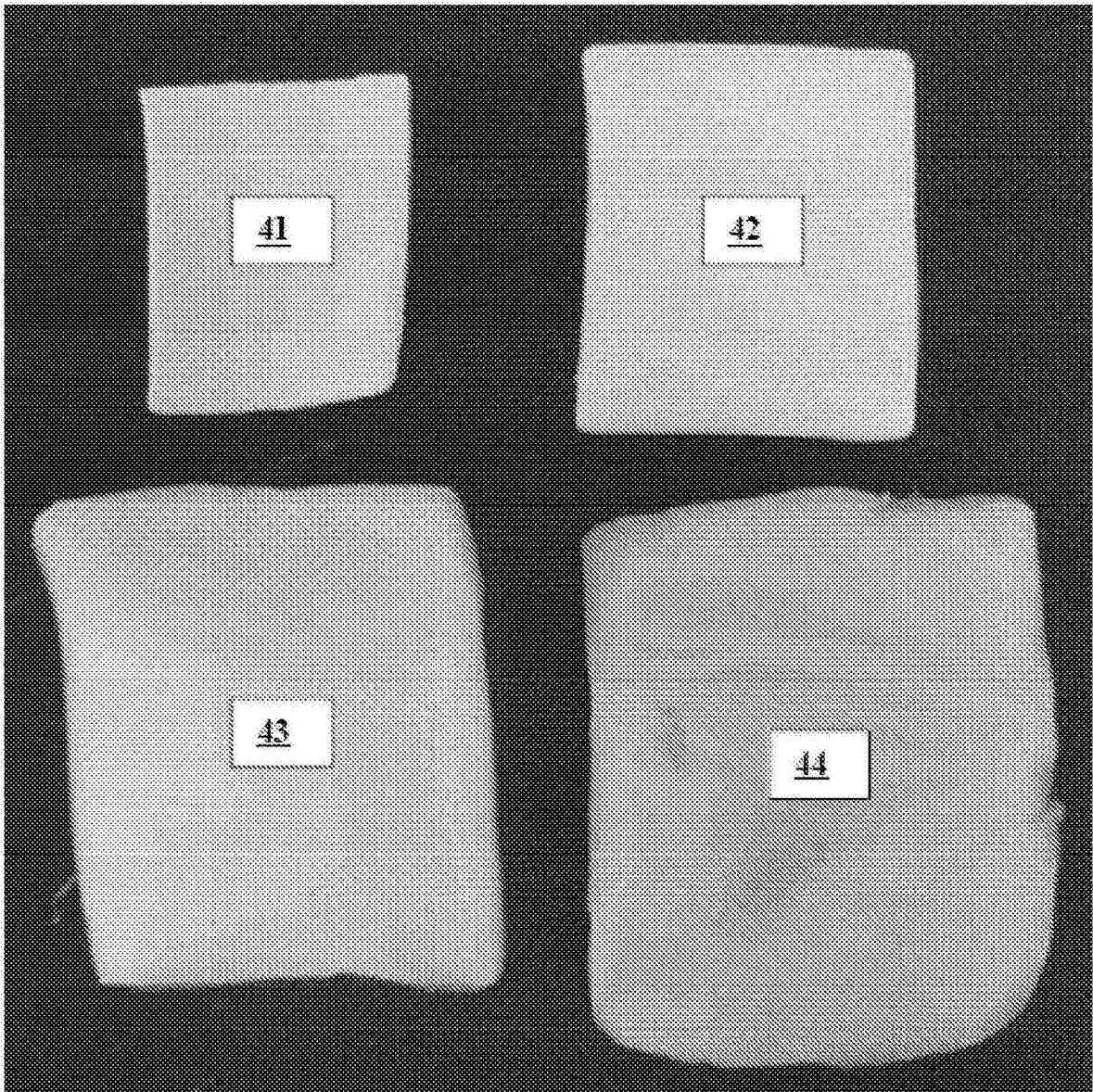


图11

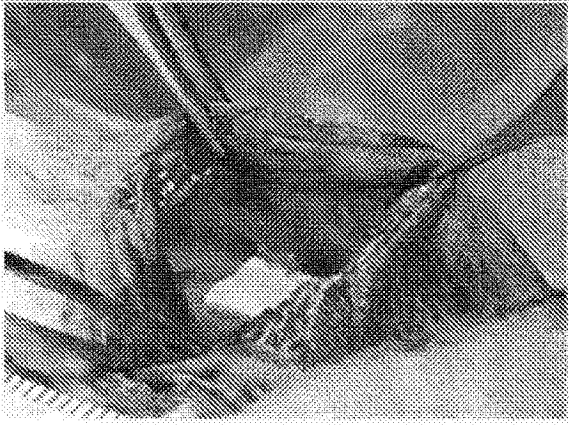


图12A

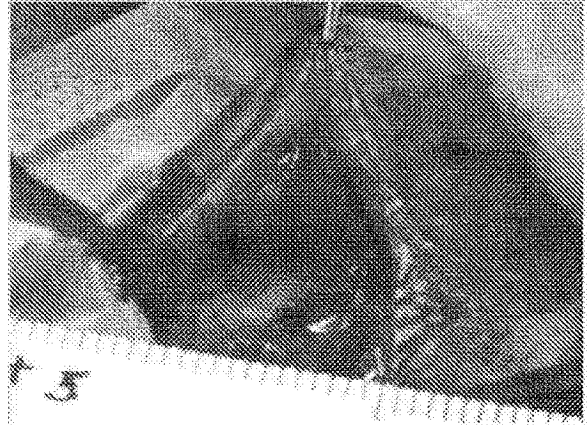


图12B

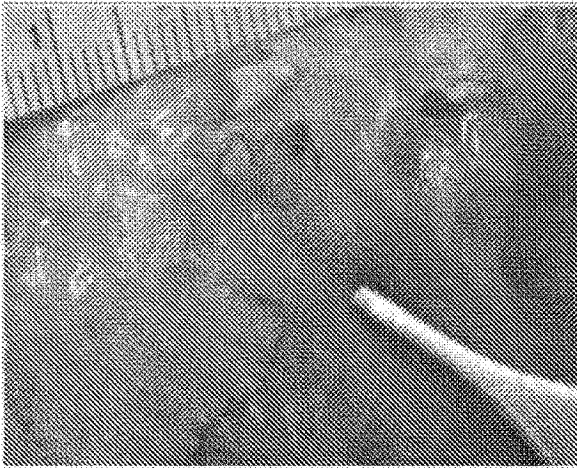


图12C

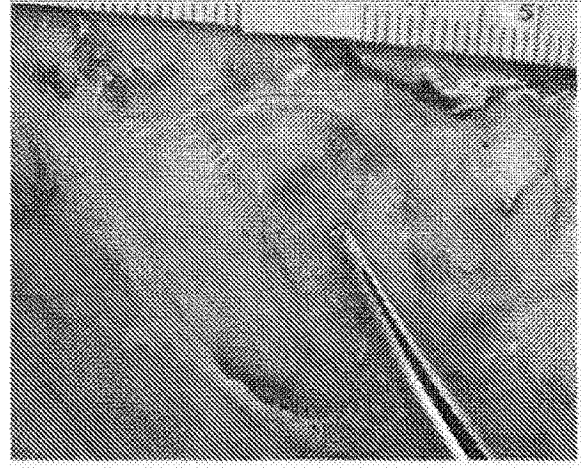


图12D

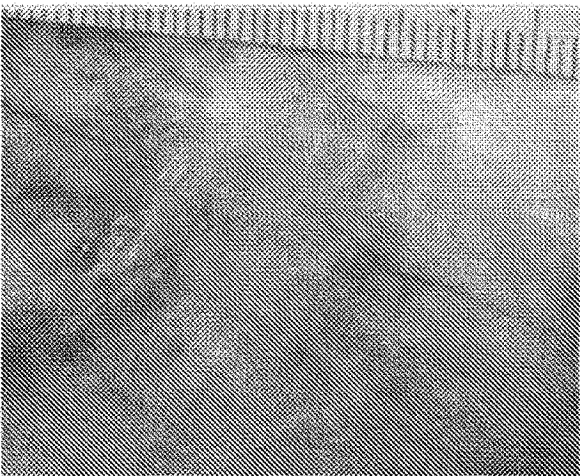


图12E

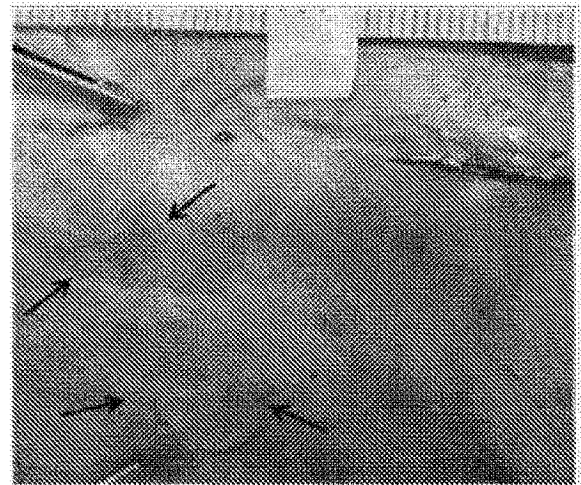


图12F

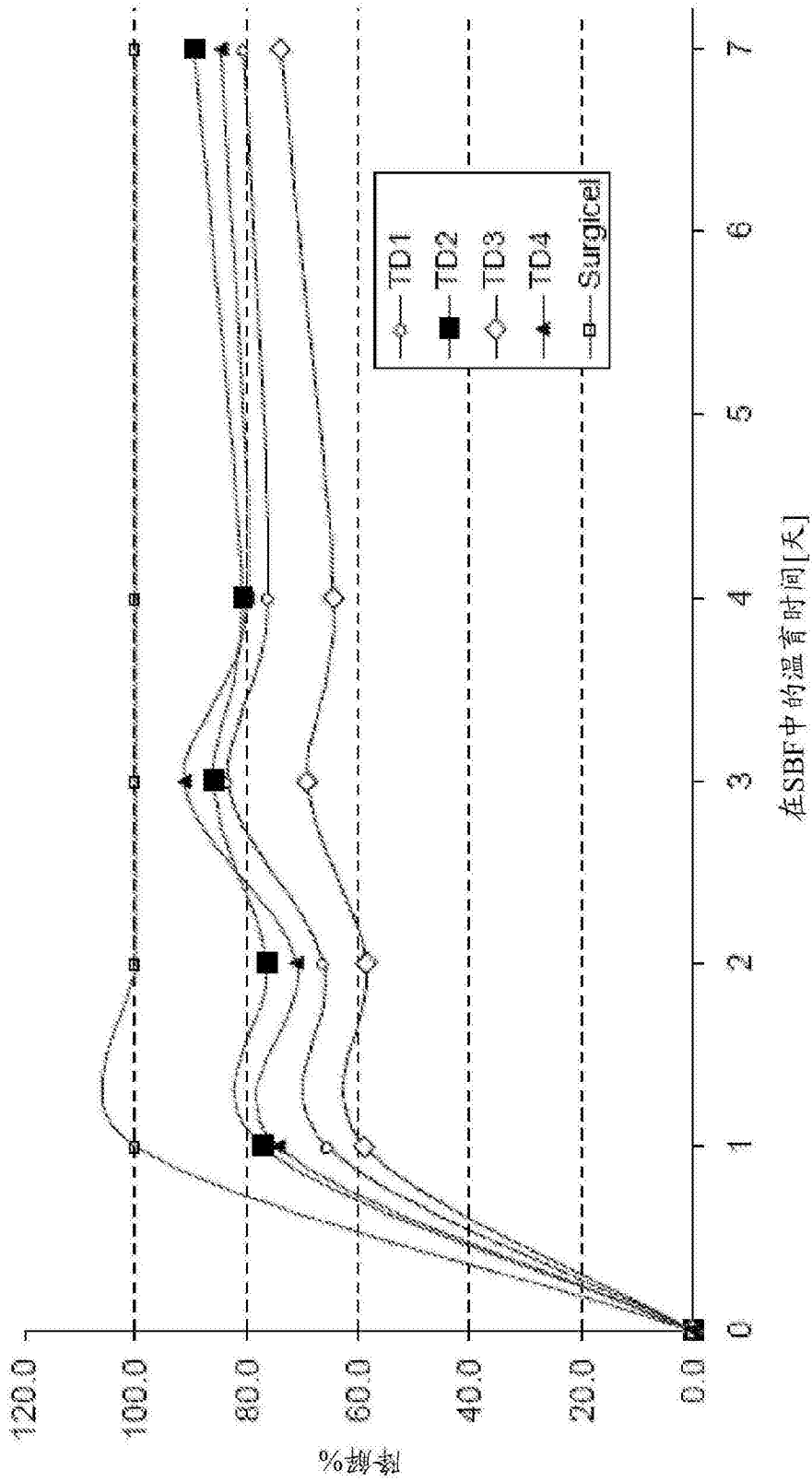


图13